



Microscopies de fluorescence et de diffraction super-résolues par éclairage multiple

Jules Girard

► To cite this version:

Jules Girard. Microscopies de fluorescence et de diffraction super-résolues par éclairage multiple. Optique / photonique. Université Paul Cézanne - Aix-Marseille III, 2012. Français. NNT: . tel-00701031

HAL Id: tel-00701031

<https://theses.hal.science/tel-00701031>

Submitted on 24 May 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Microscopies de fluorescence et de diffraction super-résolues par éclairage multiple

Thèse présentée et soutenue publiquement
le 2 décembre 2011 par
Jules GIRARD

Pour l'obtention du grade de
Docteur en sciences de l'université d'Aix Marseille III
Faculté des Sciences et Techniques
Discipline : Optique, Photonique et Traitement d'Image

*Institut Fresnel, équipe S.E.M.O.
École Doctorale Physique et Sciences de la Matière*

Membres du jury :

M. Laurent COGNET, Directeur de Recherche, CNRS	<i>rapporteur</i>
M. Olivier HAEBERLÉ, Professeur, Université de Haute-Alsace	<i>rapporteur</i>
M. Rainer HEINTZMANN, Professeur, Université de Jena	<i>examineur</i>
Mme Anne TALNEAU, Directrice de Recherche, CNRS	<i>examinatrice</i>
M. Emmanuel FORT, Maître de conférences, Université Paris 7	<i>examineur</i>
Mme. Anne SENTENAC, Directrice de Recherche, CNRS	<i>directrice de thèse</i>

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier le directeur de l'Institut Fresnel, Hugues Giovannini, pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire, où j'ai pu effectuer un travail de recherche dans d'excellentes (!) conditions.

Je souhaite ensuite exprimer ma reconnaissance à Anne Sentenac, pour avoir encadré ma thèse avec enthousiasme et bonne humeur, pour m'avoir permis de faire de la science entre deux programmes LabView et pour m'avoir donné goût à l'électromagnétisme et aux développements en ondes planes. J'ajoute à cela ma sincère gratitude pour nombreuses les relectures et corrections apportées à ce manuscrit.

La recherche est un travail d'équipe, et je suis très bien placé pour le savoir. Je tiens donc à remercier chaleureusement tous ceux qui ont fortement contribué aux travaux présentés dans ce manuscrit, en particulier Emeric Mudry, Eric Le Moal et Guillaume Maire, mais également Kamal Belkebir, Hugues Giovannini, Anne-Laure Fehrembach, Anne Talneau, Andrea Cattoni, Geoffroy Scherrer, Benoit Cluzel et Cendrine Nicoletti.

I would like to express my gratitude to Pr. Rainer Heintzmann for giving me the honor of taking part to my jury, and for all the significant help he provided on experimental and theoretical matters.

J'adresse de sincères remerciements aux membres extérieurs de mon jury de thèse : Anne Talneau, Emmanuel Fort, Rainer Heintzmann, et plus particulièrement à Laurent Cognet et Olivier Haeberlé qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Je remercie l'ensemble de l'équipe SEMO pour l'ambiance particulièrement agréable que j'ai pu y trouver, pour la disponibilité, la compétence et la patience de tous ses membres, pour toutes les aides qui m'ont été apportées. Merci à Kamal, Virginie, Hugues, Patrick, Guillaume, Gabriel, Nicolas et Anne.

Je remercie également Hervé, et l'ensemble des permanents de l'équipe MOSAIC, Guillaume, Sophie, Julien, Cyril, Patrick, Serge et Jérôme, pour m'avoir accueilli dans cette équipe, malgré la distance « géographique » et parfois thématique de mon travail. Je suis reconnaissant pour les conseils divers (sur certains aspects expérimentaux, sur la recherche de postdoc, ou le choix de cette thèse !), pour les discussions fructueuses et les présentations enrichissantes lors des réunions de groupe, et bien sûr, pour Cargèse et les repas sur la plage du Prado...

Un grand merci à toute l'équipe administrative et « technique » de l'Institut Fresnel, pour votre bonne humeur, votre efficacité et parfois votre patience ! Un merci particulier à Nelly, Magalie et Guylène qui ont assuré malgré les demandes administratives souvent effectuées au dernier moment...

Je remercie enfin ceux qui m'ont apporté leur aide précieuse lors de mon séjour au LPN, et en particulier Stéphane Guilet, Xavier Lafosse, Dominique Decanini, Christophe David, Andrea Cattoni, Isabelle Sagnes et bien sûr Anne Talneau.

I would also like to thank Pr. Colin Sheppard for his welcome during my visit in Singapore and for sharing his great experience and knowledge in optics and microscopy with such enthusiasm.

Je n'oublie pas les autres équipes du troisième étage, qui ont fait de notre salle à café le prestigieux carrefour de la Science, de la politique et du calembour de haut-vol, et qui me manquera beaucoup. Un grand merci, donc, à Frederic, Andre, Gerard, Thomas, Nicolas, Boris, Anne-Laure, Brian, Sébastien, Gilles, Stefan, Hervé, Pierre, Christelle, Amélie et Jean-Michel.

Je remercie les doctorants, postdocs et « BIATOSS » grâce à qui je me souviendrai longtemps de ces trois années passés dans une ambiance formidable. Merci à Slimane, Pierre G, Emeric, David, Yi & Ting, Sofiane, Doudou, Pierre B, Olivier, Alicja, Peter, Fabiana, Fatma-Zohra, Esben, Alla, Dora, Sophie, Heykel, Brice, Muamer, Claire, Nelly, Jean. Merci aux basketteurs Julien, Pascal, Tieh-Ming, Francesco, Xiao, Cesar, David, Richard, pour les bash, le défoulement et les doigts foulés, et pour avoir pris soin du tendon de qui vous savez ;-)

Un grand merci à Natacha, Fabrice, Nicolas S, Xavier et Benoit pour m'avoir encouragé et soutenu lors des dernières étapes de rédaction, pour avoir contribué à mon salaire de fainéant en payant leurs impôts, et surtout, pour leur amitié. Merci à Nicolas B pour tout ce qu'il m'a laissé. Merci également à Julien L & Caroline, Benjamin & Marion, Florent & Adeline, Ludo, Vincent, Eric & Séverine, Julien B & Marion, Anaïs & Roman pour les bons moments passés loin du labo.

Merci à Elise, qui a fait de ces trois dernières années les trois meilleures dont je me souviens.

Merci à ma famille, à qui je dois tout (ou presque).

Si certains ont été remerciés plusieurs fois, c'est normal : ils le méritent.

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	3
Notations	7
Chapitre I. Super-résolution en microscopie optique : Introduction et considérations générales	9
Introduction	9
I.1. La diffraction, limite majeure de la microscopie optique	11
I.1.1. Définition de la résolution	11
I.1.2. Modélisation de l'image formée par un microscope optique	14
I.1.3. Cas de la microscopie cohérente par diffraction sur un échantillon 3D	21
I.1.4. Cas de la microscopie de fluorescence sur un échantillon 2D	24
I.2. Super-résolution par éclairage multiple	29
I.2.1. Principe du moiré	29
I.2.2. Cas de la tomographie optique de diffraction sur un échantillon 3D	33
I.2.3. Cas de la microscopie de fluorescence sur un échantillon 2D	35
I.3. Autres méthodes de super-résolution	37
I.3.1. Champ proche optique : utilisation des ondes évanescentes	37
I.3.2. Traitement numérique et déconvolution	39
I.3.3. Imagerie point par point : PALM et STORM	41
I.3.4. Utilisation des phénomènes non-linéaires	44
Chapitre II. Super-résolution par tomographie optique de diffraction	51
Résumé du chapitre	51
Introduction	52
II.1. Modélisation théorique rigoureuse du problème direct	53
II.1.1. Modélisation rigoureuse du problème direct : approche non-linéaire	54
II.1.2. Diffusion multiple et conséquences sur la limite de diffraction.	59
II.2. Résolution du problème inverse	62
II.2.1. Principe de l'algorithme	62

II.2.2.	Calcul des termes correctifs	64
II.2.3.	Estimations de départ	66
II.3.	Dispositif expérimental	67
II.3.1.	Montage optique	67
II.3.2.	Mesures	69
II.3.3.	Fabrication de l'échantillon	71
II.4.	Traitement des données expérimentales	72
II.4.1.	Calibration angulaire	72
II.4.2.	Origine des phases	73
II.4.3.	Normalisation en phase et amplitude	75
II.4.1.	Correction des aberrations	76
II.5.	Résultats expérimentaux	77
II.5.1.	Validation de l'inversion non-linéaire et comparaison avec une inversion linéaire	77
II.5.2.	Super-résolution sur des échantillons fortement diffractants	80
Chapitre III.	Techniques d'éclairement structuré en microscopie de fluorescence	85
	Résumé du chapitre	85
	Introduction	86
III.1.	Montage expérimental pour éclairage structuré classique	87
III.1.1.	Montage avec réseau de diffraction « fixe » en transmission	88
III.1.2.	Gestion de la polarisation des faisceaux incidents	90
III.1.3.	Détection du signal	92
III.1.4.	Protocole d'acquisition du set d'images	94
III.2.	Traitement des images avant inversion	95
III.2.1.	Estimation de la PSF du microscope	95
III.2.2.	Correction du fond	96
III.2.3.	Correction de la dérive de l'échantillon	97
III.2.4.	Sur-échantillonnage de l'image	98
III.3.	Méthodes d'inversion	99
III.3.1.	Algorithmes d'inversion classiques	99
III.3.2.	Estimation de la densité de fluorophores par gradient conjugué	101
III.3.3.	Estimation conjointe de la densité de fluorophores et des fonctions d'éclairement par gradient conjugué	104
III.4.	Résultats expérimentaux de reconstruction en éclairage structuré	108

III.5.	Éclairement structuré par des speckles aléatoires	111
III.5.1.	Montage expérimental	112
III.5.2.	Résultats simulés	114
III.5.3.	Résultats expérimentaux	117
Chapitre IV.	Éclairement structuré assisté par réseau	121
	Résumé du chapitre	121
	Introduction	122
IV.1.	Conception des réseaux résonnants	124
IV.1.1.	Guide d'onde plan diélectrique	124
IV.1.2.	Réseau de couplage	128
IV.1.3.	Optimisation des réseaux résonnants	131
IV.2.	Utilisation des réseaux résonnants pour l'imagerie	134
IV.2.1.	Mode d'éclairement à une seule onde plane	134
IV.2.2.	Mode d'éclairement par deux ondes planes	136
IV.3.	Fabrication des réseaux résonnants sur lamelle de verre	138
IV.3.1.	Dépôt de la couche diélectrique de silicium amorphe	138
IV.3.2.	Gravure du réseau	140
IV.3.3.	Planarisation	143
IV.3.4.	Résumé du procédé de fabrication	147
IV.4.	Caractérisation du champ électrique en surface des réseaux résonnants	148
IV.4.1.	Caractérisation en champ proche	148
IV.4.2.	Caractérisation en champ lointain	154
	Conclusion générale	161
	Annexe A : Montage avec modulateur spatial de lumière	165
	Bibliographie	169

Notations

ω : Pulsation de l'onde électromagnétique

ε : Permittivité diélectrique relative d'un matériau

n : Indice de réfraction optique d'un milieu ($= \sqrt{\varepsilon\mu_r} = \sqrt{\varepsilon}$ dans un milieu non magnétique)

k_0 : nombre d'onde dans le vide ($= \omega/c = 2\pi/\lambda_0$)

k : nombre d'onde dans un milieu d'indice n ($= nk_0$)

λ_0 : longueur d'onde dans le vide ($= 2\pi c/\omega$)

λ : longueur d'onde dans un milieu d'indice n ($= \lambda_0/n$)

$\vec{k}(\alpha, \beta, \gamma)$: vecteur d'onde, décrivant l'onde plane progressive d'équation :

$$E(x, y, z, t) = Ae^{i(\alpha x + \beta y + \gamma z) - i\omega t}$$

Conventions d'écriture adoptées

Unité imaginaire

$$i^2 = -1$$

Racine carré d'un
nombre < 0

$$\text{Si } x < 0, \text{ alors } \sqrt{x} = i\sqrt{-x},$$

Vecteur position

$$\vec{r} = r = (x, y, z) \text{ pour un calcul 3D, ou } \vec{r} = r = (x, y) \text{ en 2D}$$

Transformée de
Fourier dans \mathbb{R}^n

$$\text{Si } \vec{r} \in \mathbb{R}^n, \text{ alors } TF[f(\vec{r})] = \tilde{f}(\vec{k}) = \frac{1}{(2\pi)^n} \int_{\mathbb{R}^n} f(\vec{r}) e^{-i(\vec{k} \cdot \vec{r})} d\vec{r}, \quad \text{avec } \vec{u} \in \mathbb{R}^n$$

TF inverse dans
 \mathbb{R}^n

$$TF^{-1}[\tilde{f}(\vec{k})] = f(\vec{r}) = \int_{\mathbb{R}^n} f(\vec{r}) e^{+i(\vec{k} \cdot \vec{r})} d\vec{k}$$

Vecteur unitaires

$$\vec{x} = (1, 0, 0), \quad \vec{y} = (0, 1, 0) \quad \text{et} \quad \vec{z} = (0, 0, 1) \quad (\text{dans un repère orthonormé})$$

Projection
transverse

$$\vec{v}_{\parallel} = (v_x, v_y, 0) \text{ lorsque } \vec{v} = (v_x, v_y, v_z)$$

Produit de
convolution

$$f(x) * g(x) = (f * g)(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x - x') g(x') dx'$$

Complexe
conjugué

$$\text{Si } f(x) \text{ (ou } x) = a + ib, \text{ alors } f^*(x) \text{ (ou } x^*) = a - ib$$

Opérateur
adjoint

$$\text{L'opérateur adjoint de } A \text{ est noté } A^{\dagger}$$

Chapitre I. Super-résolution en microscopie optique :

Introduction et considérations générales

Introduction

Liée à la nature ondulatoire de la lumière, la limite de diffraction définit une borne de résolution maximale pour un microscope optique. À la fin du XIXème siècle, Ernst Abbe [1] a étudié ce phénomène, et donné une limite théorique à la dimension des détails qu'on peut espérer « résoudre » avec un microscope optique standard. Cette limite, proportionnelle à la longueur d'onde utilisée, a conduit au développement de techniques de microscopie telles que la microscopie à rayons X ou la microscopie électronique. Ces techniques utilisent des particules (respectivement électrons et photons X) d'énergie bien plus grande que les photons visibles. Leurs longueurs d'onde¹ sont donc bien plus petites : de 1Å pour les rayons X à 0.01Å pour les électrons accélérés d'un Microscope électronique à transmission. Leur résolution est alors principalement limitée par d'autres phénomènes que la diffraction : capteur de petite taille et faible ouverture numérique, interaction objet/particule sur une zone élargie, aberrations...

La microscopie optique, plus accessible, moins invasive et d'avantage compatible avec le vivant, est loin d'avoir été abandonnée pour autant. L'amélioration de sa résolution revêt un intérêt majeur pour de nombreuses applications, allant de la biologie à la micro-

¹ Au sens de de Broglie, pour les électrons en particulier ($\lambda = h/p$)

électronique. De nombreux travaux [2-5] effectués au cours des 30 dernières années, ont montré qu'il était possible d'étendre la résolution d'un microscope bien au-delà de ce que prévoyait Abbe et la limite de diffraction. En fait, un système d'imagerie optique agit comme un filtre et une seule mesure (image) ne peut pas apporter plus qu'une certaine quantité d'informations. En jouant sur certains degrés de liberté de la mesure et en combinant les informations apportées par plusieurs d'entre elles, il est toutefois possible de reconstruire une image super-résolue [6]. Lukosz avait proposé dès 1967 plusieurs solutions pour augmenter la résolution d'un microscope en reconstruisant une image avec plusieurs mesures [7,8]. Ce n'est qu'avec la généralisation du traitement informatique des mesures et des images que cette idée a pu être mise en pratique efficacement. La manière d'éclairer l'objet observé est un des degrés de liberté de la mesure ; utiliser les images obtenues avec plusieurs éclairagements différents est aujourd'hui le dénominateur commun d'un grand nombre de techniques de super-résolution en optique et en particulier de celles que nous présentons dans cette thèse.

Ce premier chapitre est consacré à poser le cadre théorique des travaux présentés dans les chapitres suivants. Nous commençons par donner une définition de la « résolution » d'un système d'imagerie, puis nous utilisons un modèle électromagnétique du microscope classique, basé sur l'optique de Fourier, pour expliquer la limite de résolution prévue par Abbe. Nous parlerons ensuite du concept d'éclairage structuré, qui est un concept commun aux chapitres suivants de cette thèse. Pour finir, nous passerons en revue les principales techniques de super-résolution aujourd'hui utilisées en microscopie optique, en tentant de mettre en évidence les principaux concepts sur lesquelles elles reposent.

I.1. La diffraction, limite majeure de la microscopie optique

I.1.1. Définition de la résolution

Avant d'essayer d'en repousser les limites, il faut préciser ce que nous entendons par « résolution ». Cela est d'autant plus important que les confusions sont nombreuses, y compris dans la littérature scientifique. Dans cette thèse, la définition que nous emploierons se veut la plus proche possible de l'origine étymologique du mot. La résolution, c'est « l'action de résoudre, de dénouer ». La résolution optique d'un système, c'est donc la capacité de ce système à résoudre les détails spatiaux d'un objet imagé. Elle ne doit pas être confondue avec la détection, la localisation ou encore la sensibilité. Nous verrons par exemple (*cf.* section I.3.3) qu'il est souvent plus facile en microscopie de connaître avec précision la position ou la taille d'un objet, que de « résoudre » deux ou plusieurs objets proches.

Pour donner une dimension quantitative à cette définition, il nous faut utiliser un critère, défini arbitrairement. En effet, en imagerie optique, les détails d'un objet ne disparaissent généralement pas brusquement en dessous d'une certaine taille : ils s'estompent au fur et à mesure que leur taille diminue. Il faut donc définir un seuil en dessous duquel le contraste est considéré trop faible pour être visible à l'œil nu, avec une caméra, voire après un traitement d'image numérique.

En 1873, Abbe [1], cherchant à comprendre le processus de formation des images par un microscope, a considéré l'image d'un réseau de diffraction. Il a constaté que, sous éclairage incident collimaté, parallèle à l'axe optique, cette image présente un contraste à condition que la période du réseau soit supérieure à :

$$P = \frac{\lambda_0}{n_{det} \sin(\theta^{det})} = \frac{\lambda_0}{NA_{det}}, \quad (I.1-a)$$

avec λ_0 la longueur d'onde dans le vide de l'éclairage utilisé, n_{det} l'indice optique du milieu entre l'objet et l'objectif du microscope et θ_{det} l'angle maximum de la lumière captée par l'objectif par rapport à l'axe optique. NA_{det} est ce qu'il a baptisé l'ouverture numérique

(« Numerische Apertur ») de détection. Abbe avait également compris que l'éclairement jouait un rôle important dans la résolution d'un microscope. Ainsi, en plaçant deux lentilles pour focaliser la lumière sur l'objet¹ avec un angle maximum θ_{inc} , dans un milieu d'indice n_{inc} , il a pu obtenir l'image d'un réseau de période :

$$P = \frac{\lambda_0}{n_{inc} \sin(\theta_{inc}) + n_{det} \sin(\theta_{det})} = \frac{\lambda_0}{NA_{inc} + NA_{det}}. \quad (I.1-b)$$

Cette période minimale correspond à ce qu'on appelle le critère d'Abbe, qui peut être reformulé en supposant $NA_{inc} = NA_{det}$:

$$d_{Abbe} = \frac{\lambda_0}{2 NA}. \quad (I.1-c)$$

En 1896, Lord Rayleigh a proposé un autre critère [9], qui porte désormais son nom, en considérant cette fois l'image de deux points. Il a cherché à déterminer la plus petite distance entre deux sources de lumière ponctuelles pour qu'elles puissent être distinguées sur leur image. Le « pouvoir de résolution » d'un microscope devient alors synonyme de « pouvoir de séparation ». Ses travaux montrent que l'image d'un objet ponctuel, obtenue avec un microscope sans aberrations et d'ouverture numérique faible, peut être correctement modélisée par une fonction d'Airy. Cette fonction, correspondant à la diffraction (de Fraunhofer) de la lumière par une ouverture circulaire [10], est représentée ci-dessous.

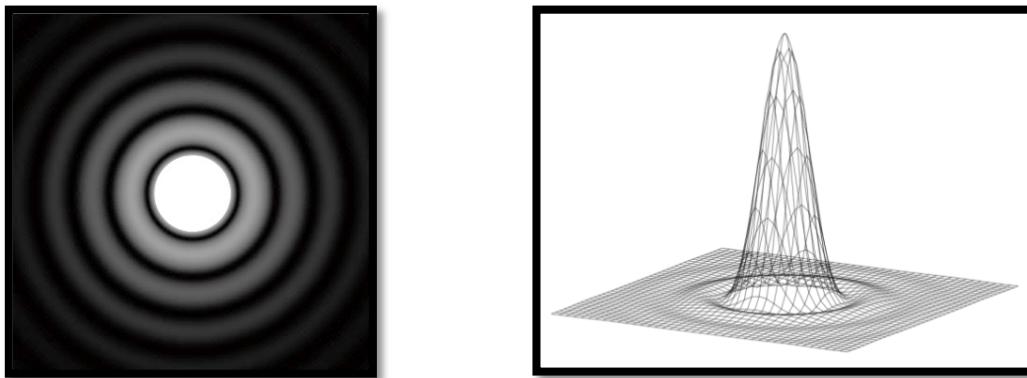


Figure I.1.1-a : Représentations de la fonction d'Airy

Dans le cadre de la fluorescence, qui est un processus d'imagerie incohérent spatialement, il y a une relation linéaire entre l'image formée et l'objet (cf. section I.2.3). Ainsi, l'image de

¹ Ces deux lentilles sont appelées condenseur d'Abbe. Ce condenseur a l'inconvénient de faire une image du filament de la lampe sur le plan de l'objet, ce qui implique une illumination inhomogène. 20 ans plus tard, August Köhler développe une technique [179] qui permet de s'affranchir de ce problème en défocalisant parfaitement l'image du filament par rapport à l'objet éclairé.

plusieurs points correspond à la somme des images de chacun d'entre eux pris séparément. On constate que plus les deux points sont rapprochés, plus il devient difficile de distinguer qu'il y a deux taches sur l'image. Le critère de Rayleigh suppose qu'à partir du moment où le centre d'une tache d'Airy se situe dans le premier minimum de l'autre, il n'est plus possible de séparer les deux. La distance du premier minimum de la fonction d'Airy par rapport à son centre donne donc la distance minimale entre deux points pour qu'on puisse les distinguer. Elle vaut :

$$d_{\text{Rayleigh}} = \frac{1,22 \lambda_0}{2 NA}. \quad (\text{I.1-d})$$

Notons que les distance critiques données par Rayleigh et Abbe diffèrent d'un facteur 1,22. Celui-ci vient du fait que le critère d'Abbe considère la résolution d'une image 2D dans une seule direction de l'espace à la fois, tandis que les sources ponctuelles de Rayleigh ont une image isotrope. Si l'on applique le critère de Rayleigh à deux droites au lieu de deux points, on retrouve le résultat d'Abbe car leur image ne correspond plus à la fonction d'Airy mais à un sinus cardinal, dont le premier minimum se situe bien à $\lambda_0/(2 NA)$ du centre de la droite. Nous souhaitons insister sur le caractère arbitraire du critère de Rayleigh. Il est tout à fait possible de distinguer les deux taches d'Airy pour une distance inférieure à d_{Rayleigh} . Sparrow [11] a par exemple formulé un autre critère, où la distance minimale entre les deux points est celle à partir de laquelle la somme des deux fonctions ne présente plus de creux entre leurs maxima. Cette distance est environ 20% plus faible que celle du critère de Rayleigh. Un troisième critère couramment utilisé, utilise la largeur à mi-hauteur¹ de la fonction. Cette valeur est assez proche de d_{Rayleigh} .

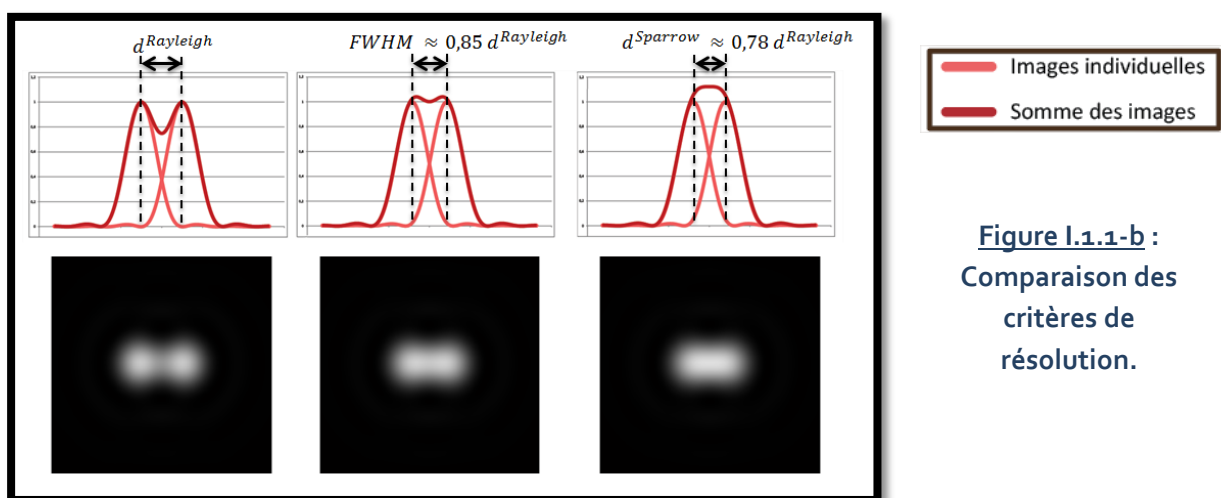


Figure I.1.1-b :
Comparaison des
critères de
résolution.

¹ En anglais FWHM pour Full Width at Half Maximum

Ces trois critères montrent leurs limites dès lors que l'objet n'est plus correctement décrit par un ensemble de points indépendants¹ de mêmes intensités, ou que leurs images ne correspondent pas à une fonction d'Airy ou toute autre fonction proche d'une gaussienne.

Finalement les approches de Rayleigh et d'Abbe sont assez différentes. Abbe s'est intéressé aux mécanismes de formation de l'image par un microscope, en y introduisant notamment les concepts de l'optique de Fourier. Elle se révèle particulièrement pertinent dès lors que l'on considère la résolution d'une image à partir des fréquences qui la compose. Lord Rayleigh a eu une approche plus empirique et pratique du problème de la résolution, en considérant un objet comme la somme des sources ponctuelles qui le composent. Cela a l'avantage d'être intuitif et direct, mais aussi en partie arbitraire et simplificateur. Nous verrons par la suite qu'à l'heure du traitement numérique des images, le point de vue « fréquentiel » se révèle souvent plus avantageux et complet.

I.1.2. Modélisation de l'image formée par un microscope optique

Idéalement, un microscope classique doit reproduire sur un capteur, œil ou caméra, le champ électrique présent au niveau de l'objet, après l'avoir agrandi. Pour cela, deux éléments suffisent : un objectif et une lentille de tube. Nous proposons d'étudier le processus de formation d'une image par un tel montage grâce à l'optique de Fourier, et de montrer la limite de résolution classique qui en résulte. Pour simplifier le problème, nous considérerons le champ électrique comme un champ scalaire. Une analyse vectorielle est généralement nécessaire pour correctement modéliser un microscope de grande ouverture numérique [12,13], mais l'approximation scalaire ne dénature pas les mécanismes qui limitent fondamentalement la résolution d'un microscope optique et que nous souhaitons ici mettre en évidence.

¹ C'est en particulier le cas avec les techniques de microscopie cohérente : le champ rayonné par un point interfère avec celui émis par d'autres points et l'image deux sources de rayonnement n'est pas égale à la somme des images de ces points pris indépendamment.

Modèle d'un microscope avec objectif corrigé à l'infini

Nous reprenons la modélisation d'un microscope proposée par Streibl [14] :

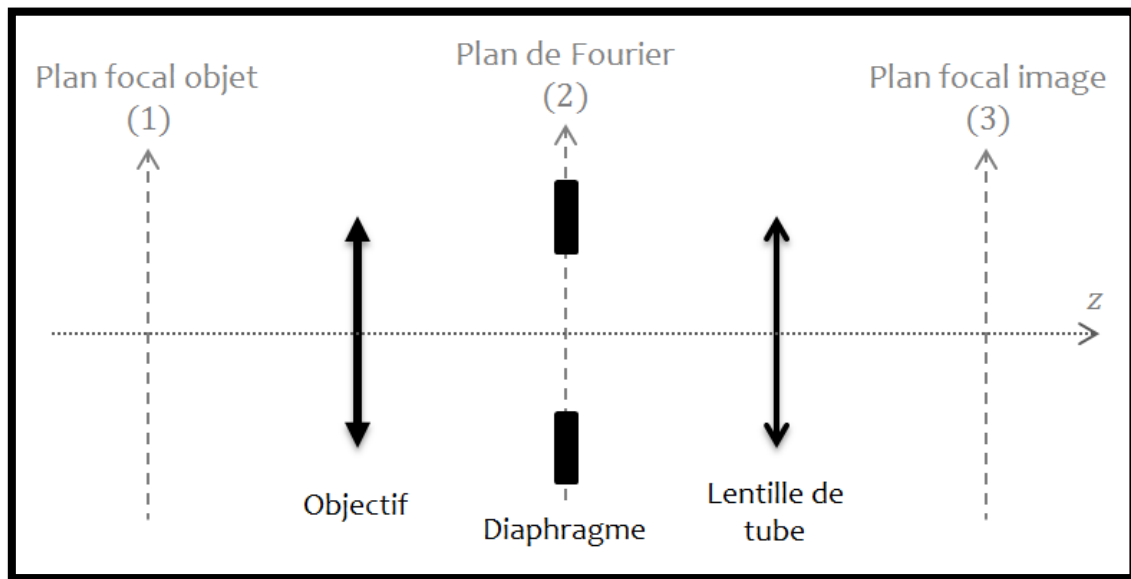


Figure I.1-3 : Modèle de microscope optique

On sépare l'espace en 3 milieux, chacun ayant leur origine propre. $E^{(1)}(x, y, z)$, $E^{(2)}(x, y, z')$ et $E^{(3)}(x, y, z'')$ sont les champs électrique au voisinage des trois plans (1), (2) et (3). Les indices sur les z servent à rappeler les changements de repères. Le plan (2), appelé plan de Fourier est à la fois le plan focal image de l'objectif et le plan focal objet de la lentille de tube. (1) est le plan focal objet de l'objectif et (3) le plan focal image de la lentille de tube. Le diaphragme dans le plan (2) symbolise la pupille d'ouverture de l'objectif, et délimite son ouverture numérique comme nous le verrons par la suite.

Développement ondes planes du champ électrique

Soit $E^{(1)}(x, y, z > 0)$, le champ électrique créé entre le plan focal objet (plan 1) et l'objectif, par un rayonnement électromagnétique monochromatique se propageant vers l'objectif (*i.e.* vers les $z > 0$). Sa nature ondulatoire, exprimée par les équations de Maxwell, lui impose une évolution temporelle caractérisée par une pulsation ω , de telle sorte que nous devrions plutôt l'écrire :

$$E^{(1)}(x, y, z, t) = E^{(1)}(x, y, z)e^{-i\omega t}. \quad (\text{I.1-e})$$

Nous nous placerons, pour le reste de cette thèse, en régime harmonique : le terme $e^{-i\omega t}$ sera dorénavant ignoré. Dans ce cadre, en l'absence de source de courant en (x, y, z) , ce champ respecte l'équation d'onde suivante, issue des équations de Maxwell :

$$\Delta E^{(1)}(x, y, z) + (n_1 k_0)^2 E^{(1)}(x, y, z) = 0, \quad (\text{I.1-f})$$

où k est le nombre d'onde, il vaut $n(\omega/c) = n2\pi/\lambda_0$ dans un milieu homogène et isotrope d'indice optique n . À partir de cette équation, en y introduisant la transformée de Fourier 2D (selon x et y) de $E^{(1)}(x, y, z = 0)$, on montre [15] que $E^{(1)}$ peut s'écrire sous la forme suivante :

$$E^{(1)}(x, y, z) = \frac{1}{4\pi^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} \tilde{E}^{(1)}(\alpha, \beta, z = 0) e^{i(\alpha x + \beta y)} e^{i\Gamma(\alpha, \beta)z} d\alpha d\beta, \quad (\text{I.1-g})$$

$$\text{avec} \quad \tilde{E}^{(1)}(\alpha, \beta, z = 0) = \tilde{E}^{(1)}(\alpha, \beta) = \iint_{-\infty}^{+\infty} E^{(1)}(x, y, 0) e^{-i(\alpha x + \beta y)} dx dy \quad (\text{I.1-h})$$

$$\text{et} \quad \Gamma_i(\alpha, \beta) = \sqrt{(n_i k_0)^2 - \alpha^2 - \beta^2}, \quad (\text{I.1-i})$$

si l'on exclut la contribution d'ondes se propageant vers les z négatifs (non collectées par l'objectif). n_i désigne l'indice optique du milieu dans lequel le champ est calculé, et donc dans ce cas le milieu entre l'objectif et le plan 1 ($i=1$). Ainsi, tout champ scalaire $E^{(1)}(x, y, z)$ peut s'écrire comme une somme d'ondes planes se propageant dans toutes les directions de l'espace. L'amplitude de chacune de ces ondes planes est directement proportionnelle à la transformée de Fourier 2D (selon x et y) du champ $E^{(1)}(x, y, z = 0)$, aux fréquences (α, β) . Cela signifie que physiquement, l'information fréquentielle transverse du champ, $\tilde{E}^{(1)}(\alpha, \beta)$, est « portée » par une onde plane se propageant dans la direction donnée par le vecteur d'onde $\vec{k}(\alpha, \beta) = \alpha\vec{x} + \beta\vec{y} + \Gamma(\alpha, \beta)\vec{z}$. Lorsque $\alpha^2 + \beta^2$ est supérieur à k^2 , $\Gamma(\alpha, \beta)$ devient imaginaire pur, l'onde correspondante est alors évanescence en z . Elle ne peut donc pas se propager à travers le microscope jusqu'à un détecteur éloigné : c'est une limite fondamentale de la résolution d'un microscope optique en champ lointain. Pour les ondes propagatives, l'angle θ entre la direction de propagation de cette onde plane et l'axe optique (défini par \vec{z}) est directement défini par le couple (α, β) :

$$\sin(\theta(\alpha, \beta)) = \frac{k_{\parallel}}{k} = \frac{\sqrt{\alpha^2 + \beta^2}}{k}. \quad (\text{I.1-j})$$

Par conséquent, plus la fréquence transverse « portée » par l'onde est grande, plus celle-ci dévie de l'axe optique.

Calcul du champ dans le plan de Fourier

La lentille de tube et l'objectif d'un microscope sont généralement conçus pour respecter la condition des sinus d'Abbe [16,17], sans quoi elles introduiraient des déformations sur les bords de l'image qu'elles forment. Cette condition se traduit [18] par la capacité à focaliser une onde plane en un point particulier du plan focal image. La distance séparant ce point et l'axe optique doit être proportionnelle au sinus¹ de l'angle θ d'incidence de l'onde plane sur la lentille. On obtient l'équation suivante dans un cas 2D :

$$x = f \sin(\theta) \quad (\text{I.1-k})$$

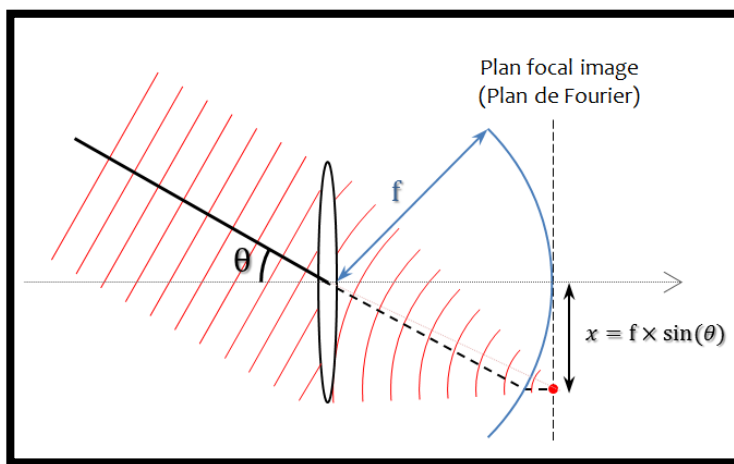


Figure I.1-4 :
Focalisation d'une onde
plane par une lentille
« parfaite » (cas 2D)

Si on considère également l'expression de $\sin(\theta)$ donnée par l'équation (I.1-j), on obtient alors la relation suivante :

$$x = f \sin(\theta) = \frac{f\alpha}{k} . \quad (\text{I.1-l})$$

La position du point de focalisation (x) dépend donc directement de la composante α du vecteur d'onde de l'onde plane focalisée. En généralisant ce résultat au cas 3D, on comprend alors qu'une lentille (ou un objectif) permet de faire une transformée de Fourier 2D « physique » du champ électrique entre ses deux plans focaux. Le champ existant dans le plan focal objet peut être décomposé en ondes planes (cf. Eq. (I.1-g)) qui sont focalisées en différents points du plan focal image selon leur direction de propagation, c'est-à-dire selon les composantes α et β de leur vecteur d'onde. Un simple tracé de rayons permet de vérifier, que d'un plan focal à l'autre, le chemin optique parcouru par ces ondes jusqu'au plan focal

¹ On peut remarquer que c'est une contradiction avec le modèle de la lentille généralement utilisé en optique géométrique, qui donne une relation en $\tan(\theta)$. En réalité, il n'est valable que dans le cadre de l'approximation de Gauss (ou approximation paraxiale), c'est-à-dire avec des angles suffisamment petits pour que $\tan(\theta) \approx \sin(\theta) \approx \theta$.

image est le même quel que soit leur angle avec l'axe optique. Au final, l'amplitude complexe du champ en un point (x,y) du plan (2) est directement proportionnelle¹ à l'amplitude de l'onde plane (donc de la composante de Fourier) correspondante, issue du plan (1). Toutefois, seules les ondes planes propagatives peuvent être transmises par la lentille et participent à la formation du champ dans le plan focal image. Il faut de plus qu'elles aient une direction de propagation comprise dans le cône de collection de la lentille, défini par son ouverture numérique.

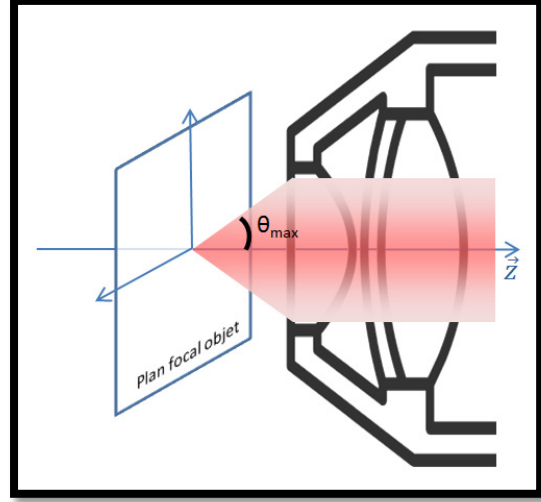


Figure I.1-5 : Cône de lumière collecté par un objectif, délimitant son ouverture numérique

Cette condition est modélisée par la présence d'un diaphragme, représenté sur la Figure I.1-3. Le champ électrique en (2) peut alors s'écrire :

$$E^{(2)}(x, y, z' = 0) \propto \tilde{E}^{(1)}\left(\alpha = xk/f, \beta = yk/f\right) \times OTF_A\left(\alpha = xk/f, \beta = yk/f\right), \quad (I.1-m)$$

la fonction OTF_A (pour Optical Transfer Function en Amplitude) étant définie par :

$$OTF_A(\alpha, \beta) = \begin{cases} 1 & \text{si } \alpha^2 + \beta^2 \leq (k_0 NA_{\text{dét}})^2 \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}, \quad (I.1-n)$$

où $NA_{\text{dét}}$ est l'ouverture numérique de l'objectif.

Calcul du champ dans le plan image

La lentille de tube effectue à son tour une transformée de Fourier du champ :

$$E^{(3)}(x, y, z'' = 0) \propto \tilde{E}^{(2)}\left(\frac{xk}{f'}, \frac{yk}{f'}, z' = 0\right). \quad (I.1-o)$$

À partir de l'équation (I.1-m), et la définition de la transformée de Fourier donnée par l'équation (I.1-h), on en déduit l'expression suivante :

¹ Une fonction « d'apodisation » de la forme $\sqrt{\cos(\theta)}$ doit normalement moduler ce résultat. Ce facteur correspond à une variation de l'angle solide de la lentille selon la direction de propagation des ondes planes, qui doit être pris en compte pour assurer la conservation de l'énergie [180]. Pour des objectifs complexes (composés de nombreuses lentilles), il prend parfois une valeur différente. Nous décidons de le négliger par la suite, pour garder une certaine simplicité dans les calculs.

$$E^{(3)}(x, y, 0) \propto \iint_{-\infty}^{+\infty} \tilde{E}^{(1)}(\alpha, \beta, z=0) e^{i(\alpha X + \beta Y)} \times OTF_A(\alpha, \beta) d\alpha d\beta, \quad (1.1-p)$$

$$\text{où} \quad X = -\frac{f'}{f}x \quad \text{et} \quad Y = -\frac{f'}{f}y. \quad (1.1-q)$$

En comparant ce résultat avec l'expression du champ donnée par l'équation (1.1-g), on constate que le champ $E^{(3)}$ est une reproduction du champ $E^{(1)}$, inversée et agrandie¹ d'un facteur f'/f , mais surtout, pour laquelle les composantes de Fourier supérieures à $k_0 NA_{\text{dét}}$ ont été annulées. Ce filtrage fréquentiel passe-bas, dû à la multiplication par l' OTF_A dans l'espace de Fourier, est la cause de la limite de résolution d'un microscope formulée par Abbe en 1873. Le grandissement n'intervient pas dans cette opération, et n'est donc pas un paramètre important pour caractériser la résolution d'un microscope. Pour simplifier les expressions, nous supposons donc par la suite que celui-ci vaut 1, de telle sorte que le champ dans le plan image s'écrive :

$$E^{(3)}(x, y, 0) \propto \iint_{-\infty}^{+\infty} \tilde{E}^{(1)}(\alpha, \beta) OTF_A(\alpha, \beta) e^{i(\alpha x + \beta y)} d\alpha d\beta. \quad (1.1-r)$$

Par la suite, nous ne nous intéresserons plus qu'au champ formé exactement dans le plan (3), c'est à dire en $z'' = 0$, que nous écrirons plus simplement $E^{(3)}(x, y) = E^{(3)}(x, y, z'' = 0)$.

La fonction de transfert optique en amplitude filtre donc l'ensemble des ondes planes dont les composantes transverses (α et β) ne vérifient pas $\alpha^2 + \beta^2 \leq (k_0 NA_{\text{dét}})^2$. Bien que cette expression puisse le laisser croire, cette sélection ne porte pas uniquement sur les fréquences transverses : pour un rayonnement monochromatique, la composante axiale est liée à α et β (cf. (1.1-i)). La fonction de transfert optique prend ainsi en 3D la forme d'une portion de sphère centrée sur l'origine de l'espace réciproque et de rayon k , dont la projection sur le plan $\gamma = 0$ donne un disque de rayon $k_0 NA_{\text{dét}}$.

¹ Le grandissement du champ électrique (et donc de l'image) ne se fait que dans les directions x et y . L'évolution du champ en z'' autour du plan (3) doit être calculée par propagation des ondes planes qui constituent le champ en $z'' = 0$.

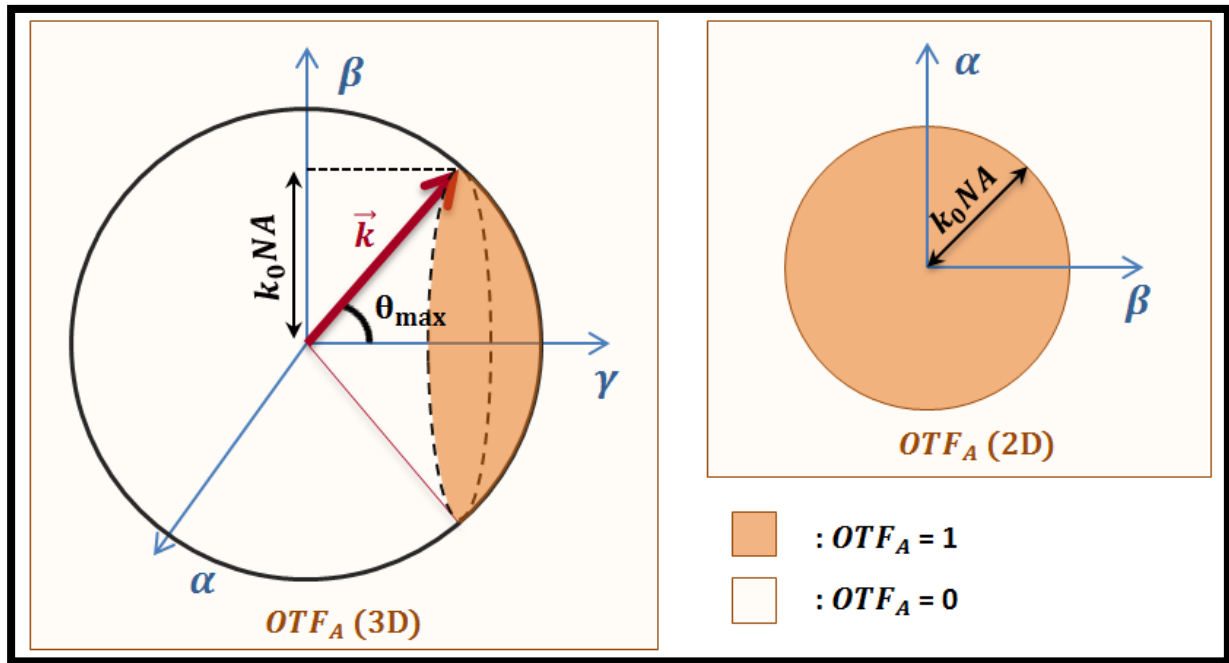


Figure I.1-6 - Représentations de la fonction de transfert optique en amplitude (2D et 3D)

Précisons que l'image observée à l'œil ou avec une caméra dans le plan image du microscope ne correspond pas à la valeur du champ électrique, mais à l'intensité lumineuse correspondante, dont la valeur est donnée par $I(\mathbf{r}) = |E(\mathbf{r})|^2 = E(\mathbf{r})E^*(\mathbf{r})$. Nous verrons qu'il est intéressant d'utiliser cette fonction lorsque les sources du rayonnement sont incohérentes entre elles (comme c'est le cas pour la fluorescence), mais qu'il est préférable de calculer d'abord le champ électrique lorsque des interférences peuvent apparaître (dans les techniques de microscopie cohérente).

I.1.3. Cas de la microscopie cohérente par diffraction sur un échantillon 3D

Nous venons de voir la relation entre le champ électrique présent au niveau de l'objet et le champ électrique « reproduit » par le microscope pour former l'image. Il faut maintenant tenter de comprendre comment se forme le champ électrique au niveau du plan (1). Nous nous plaçons dans un premier temps dans le cadre de la microscopie cohérente, où nous nous intéressons au champ diffracté par un objet tridimensionnel lorsque celui-ci est éclairé par une onde monochromatique.

Nous partons à nouveau de l'équation de Helmholtz scalaire, issue des équations de Maxwell en régime harmonique. L'équation (I.1-f) en est une formulation particulière, que respecte le champ électrique formé par des ondes monochromatiques se propageant dans un milieu homogène. Dans le cas où le milieu non homogène, décrit par une permittivité relative $\varepsilon_r(\mathbf{r})$, cette équation devient :

$$\Delta E(\mathbf{r}) + \varepsilon_r(\mathbf{r})k_0^2 E(\mathbf{r}) = S(\mathbf{r}). \quad (\text{I.1-s})$$

$\varepsilon_r(\mathbf{r})$ représente la distribution spatiale de la permittivité relative ($n = \sqrt{\varepsilon_r}$ pour un matériau non magnétique) et $S(\mathbf{r})$ répartition des sources qui servent à éclairer l'objet. Pour distinguer la permittivité relative de l'objet étudié de celle du milieu dans lequel il est placé, on introduit le « contraste de permittivité », défini par la fonction suivante :

$$\Delta\varepsilon(\mathbf{r}) = \varepsilon_r(\mathbf{r}) - \varepsilon_{r,ref}(\mathbf{r}), \quad (\text{I.1-t})$$

où $\varepsilon_{r,ref}(\mathbf{r})$ donne la permittivité du milieu dans lequel est placé l'objet en l'absence de celui-ci. Cette fonction présente la particularité d'être nulle partout en dehors de l'objet.

L'équation (I.1-s) peut alors être reformulée ainsi :

$$\Delta E(\mathbf{r}) + \varepsilon_{r,ref}k_0^2 E(\mathbf{r}) = S(\mathbf{r}) - \Delta\varepsilon(\mathbf{r})k_0^2 E(\mathbf{r}). \quad (\text{I.1-u})$$

Pour résoudre cette équation, nous utilisons la fonction de Green, définie par :

$$\Delta G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') + \varepsilon_{ref}k_0^2 G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = -\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}'). \quad (\text{I.1-v})$$

Elle correspond donc à l'expression du champ créé en \mathbf{r} par une source ponctuelle placée en \mathbf{r}' dans le milieu de référence en l'absence de l'objet. Le signe moins dans le terme source est ajouté dans la définition de G pour simplifier l'écriture des équations suivantes. En utilisant cette fonction, et la linéarité de l'équation (I.1-s), nous pouvons donner une expression du champ total, solution de l'équation (I.1-u) :

$$\begin{aligned} E_{tot}^{(1)}(\mathbf{r}) &= \int -G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') S(\mathbf{r}') d\mathbf{r}' + \int G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \Delta \varepsilon(\mathbf{r}') k_0^2 E_{tot}^{(1)}(\mathbf{r}') d\mathbf{r}' \\ &= E_{ref}^{(1)}(\mathbf{r}) + E_d^{(1)}(\mathbf{r}). \end{aligned} \quad (I.1-w)$$

Celui-ci est donc décrit par la somme de deux termes. $E_{ref}^{(1)}(\mathbf{r})$ est appelé « champ de référence » et correspond au champ total qui existerait en l'absence d'objet diffractant. Il est généralement connu et contrôlé. $E_d^{(1)}(\mathbf{r})$ est le champ diffracté par l'objet. Son expression montre que chacun des points \mathbf{r}' de l'objet où le contraste de permittivité et le champ total ne sont pas nuls, joue le rôle d'une source de rayonnement dans le vide. Bien que les deux termes contribuent à la formation de l'image¹ dans le plan (3), nous ne nous intéresserons par la suite qu'au second, car il est le seul à porter une information sur l'objet. De plus, nous nous restreindrons dans la suite de cette étude à un cas simple d'un objet placé dans le vide ($\varepsilon_{ref}(\mathbf{r}) = 1$). Dans ce cas, et plus généralement lorsque $\varepsilon_{ref}(\mathbf{r})$ est une fonction constante, l'équation (I.1-v) montre que la fonction de Green ne dépend plus que d'une seule variable : $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = G(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$.

Nous voulons maintenant réécrire le champ diffracté sous la forme donnée dans l'équation (I.1-g), pour en déduire le champ qui sera reproduit dans le plan objet par le microscope. Nous utilisons pour cela le développement en ondes planes de la fonction de Green dans le vide, dont le calcul peut être trouvé dans [19]:

$$G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = \frac{1}{8i\pi^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\Gamma(\alpha, \beta)} e^{i(\alpha(x-x') + \beta(y-y') + \Gamma(\alpha, \beta)|z-z'|)} d\alpha d\beta \quad (I.1-x)$$

Pour simplifier le calcul, nous placerons systématiquement le plan focal objet de l'objectif (1) (*i.e.* là où nous calculons $E_d^{(1)}(\mathbf{r})$) au-dessus de l'objet diffractant, de telle sorte que $|z - z'| = z - z'$ quand $\Delta \varepsilon(\mathbf{r}')$ est non nul.

Nous pouvons maintenant insérer cette expression de G dans celle de $E_d^{(1)}(\mathbf{r})$ donnée par l'équation (I.1-w) :

¹ Celle-ci correspond à l'intensité lumineuse, donnée par le module au carré du champ électrique complexe : $I^{(3)} = |E_{ref}^{(3)} + E_d^{(3)}|^2$

$$E_d^{(1)}(\mathbf{r}) = \iiint G(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \Delta \varepsilon(\mathbf{r}') k_0^2 E_{tot}^{(1)}(\mathbf{r}') d\mathbf{r}' \quad (\text{I.1-y})$$

devient

$$E_d^{(1)}(\mathbf{r}) = \frac{k_0^2}{8i\pi^2} \iiint_{-\infty}^{+\infty} \left(\iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\Gamma(\alpha, \beta)} e^{i(\alpha(x-x') + \beta(y-y') + \Gamma(\alpha, \beta)(z-z'))} d\alpha d\beta \right) \times \Delta \varepsilon(x', y', z') E_{tot}^{(1)}(x', y', z') dx' dy' dz'. \quad (\text{I.1-z})$$

En inversant l'ordre des intégrales, nous pouvons réécrire le champ diffracté comme une somme d'ondes planes :

$$E_d^{(1)}(\mathbf{r}) = \frac{k_0^2}{8i\pi^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} A(\alpha, \beta) e^{i(\alpha x + \beta y + \Gamma(\alpha, \beta)z)} d\alpha d\beta \quad (\text{I.1-aa})$$

avec

$$A(\alpha, \beta) = \frac{1}{\Gamma(\alpha, \beta)} \iiint_{-\infty}^{+\infty} \Delta \varepsilon(\mathbf{r}') E_{tot}^{(1)}(\mathbf{r}') e^{-i(\alpha x' + \beta y' + \Gamma(\alpha, \beta)z')} dx' dy' dz'. \quad (\text{I.1-bb})$$

En utilisant le théorème de convolution, on peut réécrire $A(\alpha, \beta)$ sous la forme suivante :

$$A(\alpha, \beta) = \frac{\widetilde{\Delta \varepsilon}(\alpha, \beta, \Gamma(\alpha, \beta)) * \widetilde{E_{tot}^{(1)}}(\alpha, \beta, \Gamma(\alpha, \beta))}{\Gamma(\alpha, \beta)}, \quad (\text{I.1-cc})$$

où $\widetilde{\Delta \varepsilon}(\alpha, \beta, \gamma)$ et $\widetilde{E_{tot}^{(1)}}(\alpha, \beta, \gamma)$ désignent respectivement les transformées de Fourier 3D du contraste de permittivité et du champ électrique total au niveau de l'objet. À partir de cette expression du champ diffracté dans le plan focal objet (1), nous pouvons calculer le champ formé dans le plan image du microscope¹ (3) en utilisant le calcul réalisé au I.1.2. Il suffit d'identifier $A(\alpha, \beta)$ avec le $\tilde{E}^{(1)}(\alpha, \beta)$ des équations (I.1-g) et donc (I.1-r). Cette dernière nous permet donc d'écrire :

$$E_d^{(3)}(x, y) \propto \iint_{-\infty}^{+\infty} OTF_A(\alpha, \beta) A(\alpha, \beta) e^{i(\alpha x + \beta y)} d\alpha d\beta, \quad (\text{I.1-dd})$$

$$E_d^{(3)}(x, y) \propto \iint_{-\infty}^{+\infty} OTF_A(\alpha, \beta) \left[\widetilde{\Delta \varepsilon}(\alpha, \beta, \Gamma(\alpha, \beta)) * \widetilde{E_{tot}^{(1)}}(\alpha, \beta, \Gamma(\alpha, \beta)) \right] \times \frac{1}{\Gamma(\alpha, \beta)} e^{i(\alpha x + \beta y)} d\alpha d\beta \quad (\text{I.1-ee})$$

Cette équation montre bien comment la longueur d'onde et l'ouverture numérique de l'objectif, à travers l' $OTF_A(\alpha, \beta)$, limitent les fréquences de l'objet (*i.e.* du contraste de permittivité) portées par le champ diffracté dans le plan image. Seule la partie du spectre

¹ Le grandissement est toujours pris égal à 1 pour simplifier les calculs

de $\Delta\varepsilon$ qui, après convolution par $\tilde{E}^{(1)}(\alpha, \beta, \gamma)$, intercepte la calotte de sphère définie par la fonction de transfert représentée en 3D (cf. Figure I.1-6) est accessible. Tout le reste du spectre (notamment les fréquences les plus élevées) n'a aucune influence sur l'image formée en champ lointain. La convolution préalable avec $\tilde{E}^{(1)}(\alpha, \beta, \gamma)$ est importante et nous verrons qu'elle pourra être exploitée pour accéder à différentes composantes de la transformée de Fourier de $\Delta\varepsilon$.

I.1.4. Cas de la microscopie de fluorescence sur un échantillon 2D

Dans cette section, nous restreindrons notre raisonnement au cas d'un objet fluorescent plan et fin, pour lequel les fluorophores se situent tous dans le plan (1), donc en $z = 0$. La notation \mathbf{r} ne désigne donc plus ici que deux coordonnées (x, y) . Nous rappelons également que nous considérons un grandissement unitaire pour simplifier les calculs.

En microscopie de fluorescence, la relation entre l'éclairement et le champ rayonné par l'objet est fondamentalement différente du cas précédent. La fluorescence correspond à l'absorption d'un photon par un fluorophore, suivi de l'émission d'un autre photon de longueur d'onde généralement plus grande. En utilisant un miroir dichroïque sélectif en longueur d'onde, on filtre la lumière d'excitation, afin que seul le signal de fluorescence participe à la formation de l'image. La fluorescence est en outre un processus spatialement incohérent. Si on suppose un éclairement constant dans le temps, il n'y a pas de corrélation entre les instants où deux particules fluorescentes différentes émettent un photon. Le champ électromagnétique, rayonné par chacune d'entre elles à l'instant t dans le plan image, peut alors s'écrire :

$$E_n^{(3)}(\mathbf{r})e^{-i\phi(n,t)} \quad (\text{I.1-ff})$$

Avec $E_n^{(3)}(\mathbf{r})$ l'amplitude complexe du champ émis dans le plan image par un fluorophore n , et $\phi(n, t)$ une phase aléatoire, correspondant au retard de l'émission du photon par rapport à l'instant t . Par linéarité des équations de Maxwell, le champ total s'écrit alors :

$$E_t^{(3)}(\mathbf{r}) = \sum_n^N E_n^{(3)}(\mathbf{r})e^{-i\phi(n,t)}, \quad (\text{I.1-gg})$$

où N est le nombre de fluorophores qui émettent des photons.

L'image qui se forme sur l'œil ou sur une caméra correspond à l'intensité du champ électrique, moyennée sur un temps d'exposition relativement long¹. Elle s'écrit alors :

$$\begin{aligned}
 I^{(3)}(\mathbf{r}) &= \langle E_t^{(3)}(\mathbf{r}) E_t^{(3)*}(\mathbf{r}) \rangle_t = \left\langle \sum_n^N E_n^{(3)}(\mathbf{r}) e^{-i\phi(n,t)} \sum_m^N E_m^{(3)*}(\mathbf{r}) e^{+i\phi(m,t)} \right\rangle_t \\
 &= \left\langle \sum_n^N \sum_m^N E_n^{(3)}(\mathbf{r}) E_m^{(3)*}(\mathbf{r}) e^{-i(\phi(n,t) - \phi(m,t))} \right\rangle_t \quad (I.1-hh) \\
 &= \sum_n^N \sum_m^N E_n^{(3)}(\mathbf{r}) E_m^{(3)*}(\mathbf{r}) \langle e^{-i(\phi(n,t) - \phi(m,t))} \rangle_t.
 \end{aligned}$$

La fonction $\phi(n, t)$ étant aléatoire selon t , on peut dire que $\langle e^{-i(\phi(n,t) - \phi(m,t))} \rangle_t = \delta_{nm}$. En moyenne, un fluorophore n'interfère donc qu'avec lui-même. On en déduit que :

$$I^{(3)}(\mathbf{r}) = \sum_n^N E_n^{(3)}(\mathbf{r}) E_n^{(3)*}(\mathbf{r}) = \sum_n^N I_n^{(3)}(\mathbf{r}) \quad (I.1-ii)$$

où $I_n^{(3)}(\mathbf{r})$ décrit l'image (en intensité) du fluorophore d'indice n . Tant qu'il est excité par un flux lumineux inférieur à un certain seuil de saturation², un fluorophore émet un nombre de photons proportionnel au nombre de photons qu'il reçoit [20,21], c'est-à-dire à l'intensité lumineuse qui l'éclaire et que nous décrivons avec la fonction $I_{inc}(\mathbf{r})$. L'image du fluorophore d'indice n situé en \mathbf{r}_n dans le plan objet peut alors s'écrire :

$$I_n^{(3)}(\mathbf{r}) \propto PSF(\mathbf{r}) * (I_{inc}(\mathbf{r}) \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_n)) \quad (I.1-ij)$$

où $PSF(\mathbf{r})$ est l'image normalisée d'un fluorophore positionné en $(0,0,0)$ dans le plan (1). Si l'on considère l'ensemble des fluorophores formant l'objet, l'image obtenue s'écrit donc :

$$\begin{aligned}
 I^{(3)}(\mathbf{r}) &= \sum_n^N I_n^{(3)}(\mathbf{r}) \propto \sum_n^N [PSF(\mathbf{r}) * I_{inc}(\mathbf{r}) \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_n)] \\
 &\propto PSF(\mathbf{r}) * \left[\sum_n^N I_{inc}(\mathbf{r}) \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_n) \right] \propto PSF(\mathbf{r}) * \left[I_{inc}(\mathbf{r}) \sum_n^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_n) \right]. \quad (I.1-kk)
 \end{aligned}$$

Nous appellerons densité de fluorophores la fonction définie par :

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_n^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_n). \quad (I.1-ll)$$

¹ Le temps d'exposition est généralement choisi de manière à ce que l'objet fluorescent ait pu émettre un très grand nombre de photons.

² Nous raisonnerons systématiquement dans un tel régime, sauf mentions contraire

C'est généralement cette fonction que l'on cherche à connaître en imagerie de fluorescence. Elle nous permet de réécrire l'image $I^{(3)}(\mathbf{r})$ sous la forme suivante :

$$I^{(3)}(\mathbf{r}) \propto PSF(\mathbf{r}) * [I_{inc}(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})], \quad (\text{I.1-mm})$$

que nous utiliserons régulièrement par la suite. Cette équation donne la relation entre l'image d'un objet fluorescent, la répartition des marqueurs fluorescents dans cet objet, et l'intensité lumineuse incidente servant à l'éclairer.

Il convient maintenant de définir la fonction *PSF* (pour *Point Spread Function*, littéralement « fonction d'étalement du point »). Pour cela, nous modélisons les fluorophores individuels par des dipôles oscillants. C'est un problème bien connu, qui doit en toute rigueur être résolu par une analyse vectorielle du champ électromagnétique. L'image du dipôle dépend en effet de l'orientation de celui-ci par rapport à l'axe optique, en particulier pour de grandes ouvertures numériques [17,19,22]. Dans la plupart des cas, les fluorophores sont libres de tourner sur eux-mêmes, plus ou moins rapidement selon la température [23]. Pour cette raison, il est courant qu'on observe un effet de moyenne sur leur orientation. Une étude vectorielle rigoureuse de la répartition du champ qui en résulte a été proposée par Török et Sheppard [24]. Dans un but de simplification et par continuité avec les parties I.1.2 et I.1.3, nous garderons une approche scalaire. Cette approximation, admise dans la littérature [25], n'est pas gênante pour des ouvertures numériques faibles car elle donne un résultat très proche de l'analyse vectorielle. Dans tous les cas, cela ne change pas la limite fondamentale de diffraction. D'autre part, il reste préférable de mesurer directement la PSF, quel que soit le modèle utilisé. En effet, les aberrations du système optique, l'étalement du spectre d'émission des fluorophores, les écarts entre l'ouverture numérique annoncée et effective d'un objectif sont autant de raisons de ne pas accorder une confiance excessive à une modélisation théorique...

Si l'on admet l'approximation scalaire, le champ électrique créé par un fluorophore vérifie donc l'équation de Helmholtz (Éq. (I.1-f)), à la différence qu'un terme source doit être ajouté à droit de cette équation. Ce terme correspond à la densité de courant locale créée par le dipôle, qui est une fonction de Dirac. Si le fluorophore se situe dans le vide¹, alors le champ qu'il rayonne correspond exactement à la fonction de Green, dont le développement

¹ Ce qui suppose que nous négligeons l'influence de l'objet marqué sur le champ rayonné par les fluorophores. Cette approximation importante est couramment admise pour des objets biologiques fins et dont l'indice optique est généralement proche de leur milieu.

en ondes planes a déjà été donnée précédemment (Éq. (I.1-x)). Le champ créé par celui-ci dans le plan image peut alors être facilement retrouvé grâce à l'équation (I.1-r):

$$E^{(3)}(x, y, 0) \propto \iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\Gamma(\alpha, \beta)} OTF_A(\alpha, \beta) e^{i(\alpha x + \beta y)} d\alpha d\beta \quad (I.1-nn)$$

L'intensité correspondante, formée dans le plan image (3) est alors facilement calculée :

$$\begin{aligned} PSF(x, y, 0) &\propto |E^{(3)}(x, y, 0)|^2 \\ &\propto E^{(3)}(x, y, 0) E^{(3)*}(x, y, 0) \\ &\propto \left[\iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\Gamma(\alpha, \beta)} OTF_A(\alpha, \beta) e^{i(\alpha x + \beta y)} d\alpha d\beta \right] \\ &\quad \times \left[\iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\Gamma(\alpha', \beta')} OTF_A^*(\alpha', \beta') e^{-i(\alpha' x + \beta' y)} d\alpha' d\beta' \right]. \end{aligned} \quad (I.1-oo)$$

En considérant le fait que $OTF_A(\alpha, \beta)$ et $\Gamma(\alpha, \beta)$ sont paires et $OTF_A(\alpha, \beta)$ réelle, on obtient :

$$PSF(x, y, z = 0) \propto \left[\iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\Gamma(\alpha, \beta)} OTF_A(\alpha, \beta) e^{i(\alpha x + \beta y)} d\alpha d\beta \right]^2, \quad (I.1-pp)$$

ce qui peut s'écrire sous la forme suivante, en utilisant le théorème de convolution [26]:

$$PSF(x, y, z = 0) \propto \iint_{-\infty}^{+\infty} OTF_I(\alpha, \beta) e^{i(\alpha x + \beta y)} d\alpha d\beta \quad (I.1-qq)$$

$$\text{avec} \quad OTF_I(\alpha, \beta) = \left[\frac{1}{\Gamma(\alpha, \beta)} OTF_A(\alpha, \beta) \right] * \left[\frac{1}{\Gamma(\alpha, \beta)} OTF_A(\alpha, \beta) \right]. \quad (I.1-rr)$$

La PSF d'un émetteur situé dans le plan focal ($z=0$) de l'objectif correspond donc à la transformée de Fourier de la fonction de transfert optique en intensité, OTF_I définie ci-dessus. Celle-ci, à un terme $\Gamma(\alpha, \beta)$ près¹, est donnée par l'auto-convolution de son équivalent en amplitude. Cette fonction est décroissante sur son support, mais celui-ci atteint des fréquences deux fois plus élevées que celui de l' OTF_A ($2k_0 NA$ vs $k_0 NA$.)

¹ Ce facteur est quasiment constant ($\approx 1/k_0$) pour des ouvertures numériques faibles. Pour les ouvertures numériques élevées, il est toujours préférable d'utiliser un modèle vectoriel pour calculer PSF et OTF .

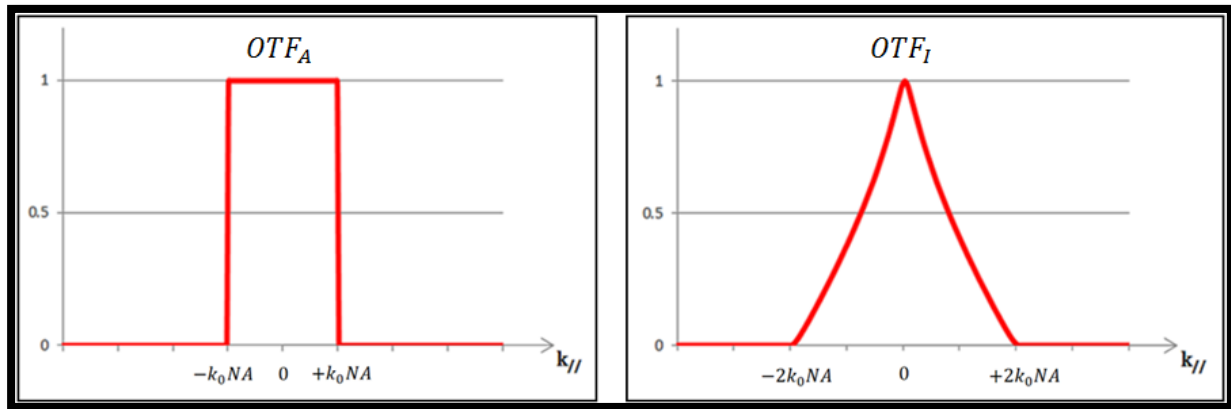


Figure I.1.4-a : Fonctions de transfert optique en amplitude et en intensité (pour $NA=0.8$).

Les travaux réalisés en microscopie de fluorescence au cours de cette thèse ne portent que sur la résolution transverse dans des échantillons supposés plans et peu épais. Toutefois, il est possible de généraliser ce résultat au cas 3D. La fonction de transfert optique en intensité est également calculée par une auto-convolution en 3D. La différence est que l'auto-convolution se fait en utilisant une expression¹ 3D de l' OTF_A (cf. par exemple [27]). Cette fonction de transfert tridimensionnelle est nulle à l'intérieur d'un cône dont l'axe correspond à l'axe des γ , ce qui se traduit par une très mauvaise résolution axiale en champ large classique.

¹ Elle est bien représentée par la calotte de sphère de la figure Figure I.1-6.

I.2. Super-résolution par éclairage multiple

Parce qu'il ne peut transmettre que certaines des ondes planes qui composent tout champ électromagnétique en optique, l'objectif d'un microscope agit comme un filtre fréquentiel « passe-bas », dont la borne supérieure dépend de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique utilisées. Parmi les techniques qui permettent de dépasser la limite de résolution qui découle de ce phénomène, un grand nombre d'entre elles utilisent la relation qui existe entre le champ rayonné ou diffracté par un objet et la manière dont on l'éclaire. Nous étudierons ici plus particulièrement l'illumination structurée [28] et la synthèse d'ouverture par tomographie optique de diffraction [29].

I.2.1. Principe du moiré

L'effet de moiré est un phénomène observable dans la vie courante, dès lors que deux objets périodiques - la maille d'une étoffe, un grillage, le capteur pixellisé d'un appareil photo, *etc.* - sont « superposés ». On constate que cet effet se traduit par l'apparition de motifs « d'interférence » de grande taille, c'est-à-dire composés de fréquences spatiales basses, qui varient selon l'orientation et la période des objets qui « interfèrent ».

Pour expliquer ce phénomène mathématiquement, il est intéressant de se placer dans l'espace de Fourier. Prenons deux fonctions f_1 et f_2 , définies par :

$$f_i(x, y) = 1 + \cos(k_{x,i}x + k_{y,i}y), \quad (1.2-a)$$

et posons
$$f_{tot}(x, y) = f_1(x, y) \times f_2(x, y). \quad (1.2-b)$$

Une représentation en niveaux de gris de ces trois fonctions, pour des $(k_{x,i}, k_{y,i})$ choisis arbitrairement, est proposée plus bas (Figure I.2.1-a). Les transformées de Fourier des f_i sont triviales :

$$\tilde{f}_i(k_x, k_y) = \delta(k_x, k_y) + \frac{1}{2}[(k_x + k_{x,i}, k_y + k_{y,i}) + \delta(k_x - k_{x,i}, k_y - k_{y,i})]. \quad (1.2-c)$$

Le théorème de convolution nous donne alors :

$$\widetilde{f}_{tot} = \widetilde{f}_1 * \widetilde{f}_2 \quad (1.2-d)$$

Le calcul de \widetilde{f}_{tot} est également trivial : la convolution d'une fonction par un pic de Dirac correspond simplement à sa translation par les coordonnées dudit pic. Le résultat obtenu se comprend aisément avec une représentation graphique dans l'espace de Fourier (cf. Figure 1.2.1-a).

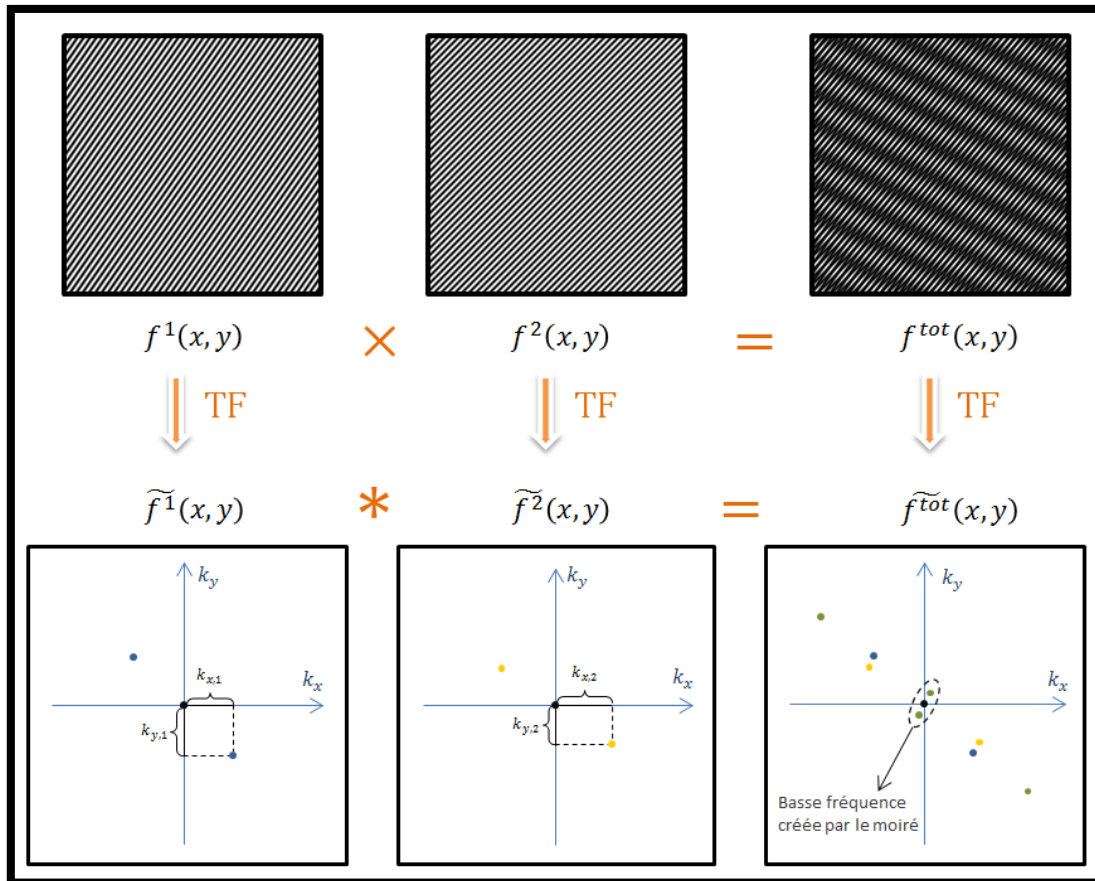


Figure 1.2.1-a : Exemple d'effet de moiré dans l'espace direct et l'espace de Fourier

La convolution dans l'espace de Fourier fait apparaître quatre nouveaux pics de Dirac. On obtient ainsi deux nouvelles composantes fréquentielles, l'une est plus élevée, l'autre plus faible que celles des fonctions f^1 et f^2 prises séparément. Cette translation des composantes spectrales d'une fonction par celles d'une autre fonction est particulièrement intéressante pour la microscopie optique, où la limite de diffraction empêche d'accéder directement aux hautes fréquences de la première. Il est possible de profiter de cette propriété de translation de spectre par effet de Moiré, lorsque « l'image » mesurée (ou sa transformée de Fourier) peut s'écrire sous la forme générale :

$$\tilde{f}_{image}(x, y) = \left(\tilde{f}_{obj}(x, y) * \tilde{f}_{ill}(x, y) \right) \times OTF(x, y) \quad (1.2-e)$$

ou encore
$$f_{image}(x, y) = \left(f_{obj}(x, y) \times f_{ill}(x, y) \right) * PSF(x, y), \quad (1.2-f)$$

où f_{obj} représente la fonction que l'on cherche à imager (le paramètre d'intérêt) et f_{ill} une fonction d'illumination qui dépend de l'éclairement. À la manière d'une lettre que l'on plie pour la faire rentrer dans une enveloppe, et que le destinataire déplie pour la lire, il est possible de « replier » (translater) le spectre d'une fonction-objet en le convoluant avec celui d'une fonction d'illumination particulière. Après multiplication par la fonction de transfert optique (l'enveloppe de taille limitée) lors du processus d'imagerie, il reste à « déplier » numériquement le spectre en séparant les « morceaux » de spectre superposés, puis en les replaçant au bon endroit par une translation inverse. On obtient alors un spectre étendu de la fonction f_{obj} , qui nous permet de former une image super-résolue. Si l'on souhaite obtenir une résolution la plus isotrope possible, il est nécessaire de faire varier les directions de modulation de la fonction d'illumination, afin de couvrir le mieux possible toute la surface accessible de l'espace de Fourier. De plus, pour distinguer la contribution des différents « morceaux » de spectre superposés dans une image, plusieurs mesures sont généralement nécessaires. Au final, la reconstruction d'une image super-résolue nécessite donc d'effectuer plusieurs mesures en changeant à chaque fois l'éclairement. Nous allons maintenant voir comment cette technique peut être appliquée à la microscopie de diffraction cohérente et à la microscopie de fluorescence.

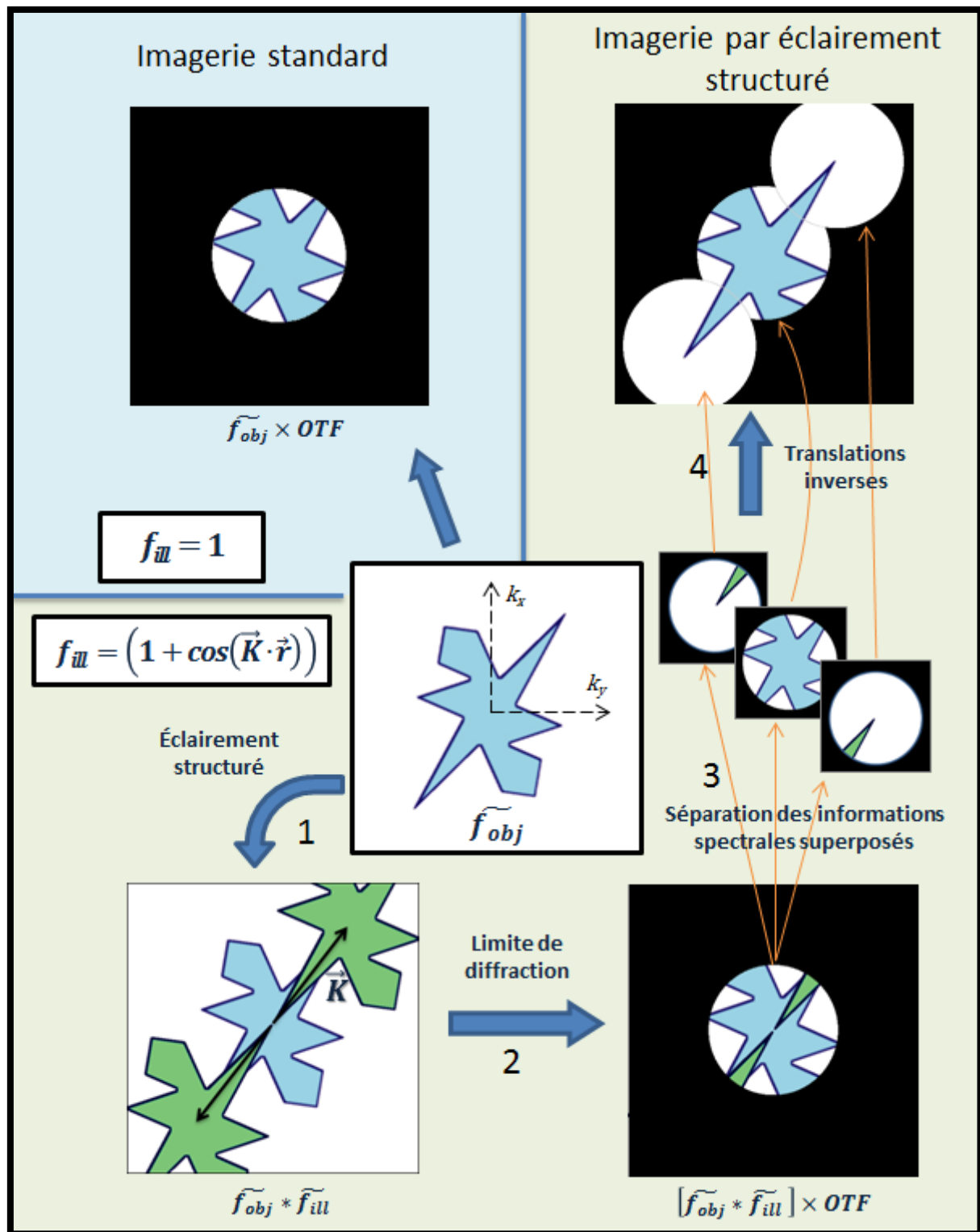


Figure I.2.1-b :
Exploitation du principe de moiré pour obtenir une image
super-résolue par éclairage structuré

I.2.2. Cas de la tomographie optique de diffraction sur un échantillon 3D

La tomographie optique de diffraction utilise le champ diffracté par un objet éclairé par une onde plane. Nous avons montré précédemment que le champ électrique formé dans le plan image du microscope pouvait s'écrire :

$$E_d^{(3)}(x, y) \propto \iint_{-\infty}^{+\infty} OTF_A(\alpha, \beta) \left[\widetilde{\Delta\epsilon}(\alpha, \beta, \Gamma(\alpha, \beta)) * \widetilde{E}_{tot}^{(1)}(\alpha, \beta, \Gamma(\alpha, \beta)) \right] \times \frac{1}{\Gamma(\alpha, \beta)} e^{i(\alpha x + \beta y)} d\alpha d\beta. \quad (1.2-g)$$

Cette fois, le champ diffracté et capté dans un plan (3) dépend de la répartition 3D du contraste de permittivité et du champ total au niveau de l'objet. Réécrire celui-ci sous la forme d'une multiplication entre deux fonctions suivie d'une simple opération de convolution n'est pas possible dès lors que l'on considère un grandissement différent de 1, car l'équation (1.2-g) n'est alors valable que dans le plan $z = 0$ (cf. note¹, page 19). Nous choisissons donc de raisonner cette fois dans l'espace de Fourier. Comme on peut le voir, chacune des ondes planes qui constituent le champ formé dans le plan (3) a une amplitude complexe proportionnelle à la convolution de deux termes : $\widetilde{\Delta\epsilon}(\alpha, \beta, \Gamma(\alpha, \beta))$ et $\widetilde{E}_{tot}^{(1)}(\alpha, \beta, \Gamma(\alpha, \beta))$. Le premier est le paramètre d'intérêt que l'on cherche à retrouver, et le second dépend de l'éclairement utilisé : cette équation est donc similaire à l'équation (1.2-e). La différence principale se situe dans le fait que le champ total $E_{tot}^{(1)}$ ne dépend pas exclusivement du champ incident : il est potentiellement influencé par l'objet. Dans de nombreux cas toutefois, l'objet observé présente un faible contraste de permittivité et diffracte peu le champ incident. On calcule alors le champ diffracté par l'objet en considérant que

$$E_{tot}^{(1)}(x, y, z) \cong E_{Ref}^{(1)}(x, y, z), \quad (1.2-h)$$

où nous rappelons que $E_{Ref}^{(1)}$ désigne le champ total qui existerait en l'absence de l'objet observé : c'est approximation de Born du premier ordre. $E_{tot}^{(1)}$ ne dépend effectivement que de l'éclairement.

Dans le cas simple où l'échantillon est éclairé par une onde plane (d'amplitude normalisée) :

$$E_{Ref}^{(1)}(x, y, z) = \exp(i(\alpha_{inc}x + \beta_{inc}y \pm \Gamma_{inc}(\alpha_{inc}, \beta_{inc})z)), \quad (I.2-i)$$

le champ diffracté s'écrit simplement (à partir de l'équation (I.2-g)) :

$$E_d^{(3)}(x, y) \propto \iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{OTF_A(\alpha, \beta)}{\Gamma(\alpha, \beta)} \widetilde{\Delta\epsilon}(\alpha - \alpha_{inc}, \beta - \beta_{inc}, \Gamma(\alpha, \beta) \mp \Gamma_{inc}) \times e^{i(\alpha x + \beta y)} d\alpha d\beta. \quad (I.2-j)$$

Le signe devant Γ_{inc} dépend de la direction de propagation de l'onde plane éclairante par rapport à la direction de collection du champ diffracté (cf. figure ci-dessous). On reconnaît maintenant une translation du spectre de $\widetilde{\Delta\epsilon}$ en fonction des trois composantes du vecteur d'onde de l'onde plane éclairante, c'est à dire de sa longueur d'onde et son angle d'incidence. En utilisant différentes incidences, on accède alors à différentes parties de $\widetilde{\Delta\epsilon}$.

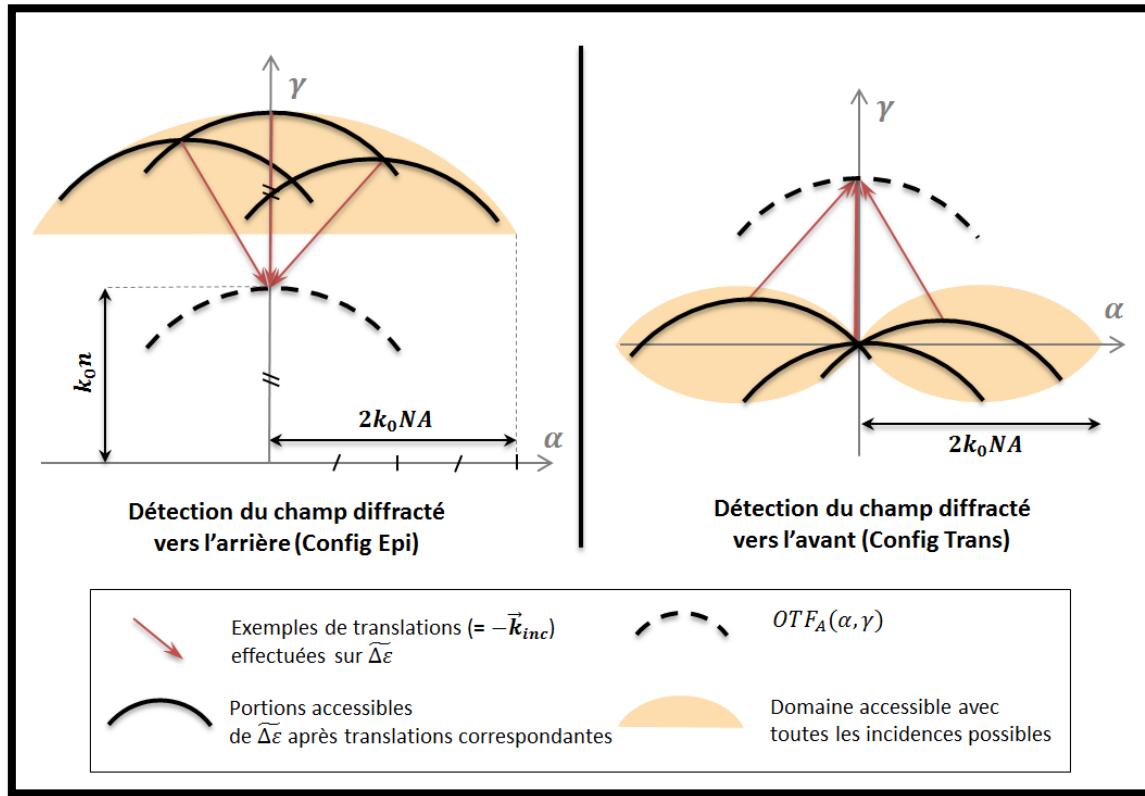


Figure I.2-3

Couverture de l'espace de Fourier en tomographie optique de diffraction sous approximation de Born (cas d'un échantillon invariant dans la direction y)

La tomographie optique de diffraction, qui est le sujet du chapitre suivant, consiste à enregistrer le champ diffracté par l'objet en faisant varier l'éclairage (en particulier

l'incidence de l'onde plane). La transformée de Fourier du contraste de permittivité est ainsi reconstituée morceau par morceau, ce qui permet de reconstruire une carte de ce paramètre avec une meilleure résolution que pour un seul éclairage : c'est la synthèse d'ouverture. Cependant, la « limite de diffraction » concerne également l'onde plane incidente. Les composantes de son vecteur d'onde, et donc la translation effectuée sur $\widetilde{\Delta\varepsilon}$, sont donc limitées par :

$$\alpha_{inc}^2 + \beta_{inc}^2 \leq (k_0 NA_{inc})^2 \quad (1.2-k)$$

et
$$\alpha_{inc}^2 + \beta_{inc}^2 + \Gamma_{inc}^2 \leq n^2 k_0^2, \quad (1.2-l)$$

où NA_{inc} désigne l'ouverture numérique dont on dispose pour éclairer l'échantillon et n l'indice optique du milieu dans lequel se trouve l'objet. Par conséquent, les plus hautes fréquences spatiales transverses et axiale de $\widetilde{\Delta\varepsilon}$ que l'on peut alors espérer récupérer sont inférieures à $k_0(NA_{inc} + NA_{det})$ et $2nk_0$, respectivement.

I.2.3. Cas de la microscopie de fluorescence sur un échantillon 2D

En fluorescence, le principe du Moiré tel que nous l'avons décrit précédemment peut être appliqué directement. En effet, l'image formée correspond bien à la multiplication de deux fonctions avant d'être convoluée par une *PSF* (cf. I.1.4) :

$$I^{(3)}(\mathbf{r}) \propto PSF(\mathbf{r}) * [I_{inc}(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})], \quad (1.2-m)$$

$I_{inc}(x, y)$, dépend de la manière d'éclairer l'échantillon. La seconde $(\rho(x, y))$, que l'on cherche à retrouver, dépend de l'objet observé. En utilisant plusieurs éclairages inhomogènes successifs, généralement des motifs sinusoïdaux, il est donc possible de récupérer des fréquences spatiales qui vont au-delà du domaine directement accessible avec un éclairage homogène [28,30], selon le principe résumé par la Figure I.2.1-b.

Malheureusement, cette technique est encore une fois limitée par le phénomène de diffraction, qui empêche l'utilisation de fréquences élevées dans l'éclairage utilisé. La plus haute fréquence latérale que $I_{inc}(x, y)$ peut contenir est définie par l'interférence de deux ondes planes incidentes avec des angles d'incidences opposés, donnés par l'ouverture

numérique d'excitation NA_{exc} . En supposant que les deux ondes sont d'amplitudes égales, on obtient alors une distribution d'intensité dans le plan qui vaut :

$$I(\vec{r}_{\parallel}) = 1 + \cos(\vec{K} \cdot \vec{r}_{\parallel} + \varphi_0), \quad (1.2-n)$$

avec

$$\|\vec{K}\| = 2k_0 NA_{exc}. \quad (1.2-o)$$

La norme de \vec{K} indique directement la longueur de la translation subie par $\tilde{\rho}$ dans l'espace de Fourier. Comme on peut le voir sur la figure ci-dessous, si l'éclairage se fait à travers la même ouverture numérique que la détection, les composantes spectrales les plus éloignées que l'on peut alors récupérer ont une pulsation égale à

$$k_{max} = 4k_0 NA, \quad (1.2-p)$$

soit exactement le double de ce que l'on obtient avec un simple éclairage homogène.

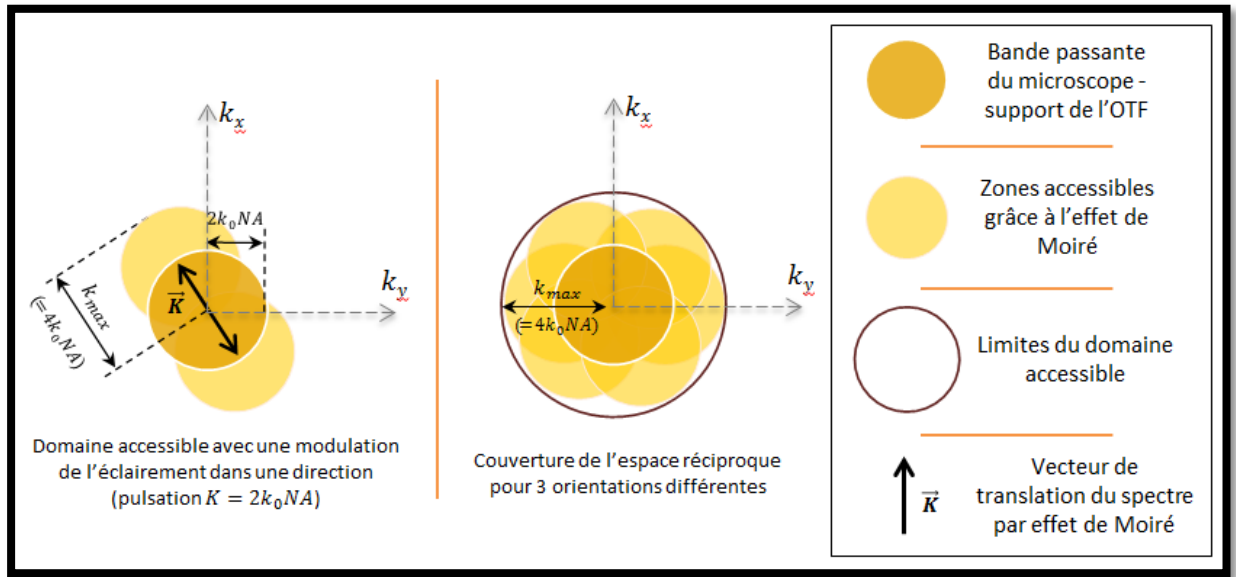


Figure 1.2-4

Couverture de l'espace de Fourier par illumination structurée en fluorescence

Bien que nous ayons choisi de focaliser notre démonstration sur l'amélioration de la résolution latérale, une modulation de l'éclairage dans la direction axiale permet également d'améliorer la résolution dans cette direction [31-34].

I.3. Autres méthodes de super-résolution

Si les travaux que nous présenterons dans le reste de cette thèse se situent clairement dans le prolongement de l'illumination structurée en fluorescence et de la tomographie optique de diffraction, déjà abordées dans les parties I.1 et I.2, nous souhaitons les situer dans le contexte bien plus large [3-5,35-38] de la super-résolution en microscopie optique. Nous nous attacherons donc dans cette partie, à décrire brièvement les principales méthodes que l'on peut trouver dans la littérature. L'objectif n'est pas d'être exhaustif, mais plutôt de décrire les concepts aujourd'hui utilisés pour dépasser la limite de diffraction (en plus de l'utilisation d'éclairements structurés) : l'utilisation des ondes évanescentes, la déconvolution, l'imagerie « point par point », et enfin les phénomènes non-linéaires.

I.3.1. Champ proche optique : utilisation des ondes évanescentes

Reprenons le développement en ondes planes du champ électrique formé au niveau de l'objet (Éq. (I.1-g)). La fonction $\Gamma(\alpha, \beta)$, définissant la composante en z des vecteurs d'onde, prend une valeur imaginaire lorsque $n^2 k_0^2 < \alpha^2 - \beta^2$. Ainsi, les ondes planes correspondantes, qui « portent » les composantes transverses de $E(\mathbf{r})$ supérieures à nk_0 , sont évanescentes en z ; elles ne peuvent donc pas être captées par un objectif placé à une distance de la zone observée très supérieure à la longueur d'onde, quel que soit son angle maximum de collection. Autrement dit, l'ouverture numérique effective d'un objectif est toujours limitée par l'indice optique du milieu dans lequel se trouve l'objet ($NA < n$). Pour atteindre des fréquences du champ électromagnétique supérieures à nk_0 , il est donc nécessaire de récupérer les ondes évanescentes, à quelques fractions de longueur d'onde de l'objet étudié. Cette piste est la première à avoir été exploitée dans l'histoire de la microscopie optique super-résolue. Dès 1928, Synge a proposé dans ses travaux [39,40] de balayer l'échantillon avec une ouverture d'une centaine de nanomètres dans une membrane opaque ou dans une pointe de quartz recouverte d'une couche métallique. En l'approchant suffisamment de la surface de l'échantillon, cette sonde est capable de diffracter une partie

des ondes évanescentes en ondes propagatives qui pourront être détectées par un capteur en champ lointain. La résolution du système d'imagerie dépend alors de la précision dans les déplacements de la sonde et surtout du volume de détection de la sonde, qui est généralement du même ordre de grandeur que la taille de l'ouverture utilisée.

Tout cela représente un certain nombre de difficultés expérimentales, si bien qu'il aura fallu attendre 1972 pour que les premiers résultats expérimentaux de cette technique soient publiés [41], voire 1984 pour les longueurs d'onde visibles [42,43]. Dans les techniques de microscopie en champ proche optique modernes¹, la sonde correspond généralement au bout d'une fibre optique étirée, et elle est positionnée puis déplacée par une platine piézo-électrique, de manière similaire à ce qui se fait pour les autres techniques de microscopie en champ proche (AFM, STM). En convertissant une partie des ondes évanescentes en ondes propagative dans la fibre, la pointe peut directement « capter » le champ proche émis ou diffracté par un objet éclairé en champ lointain. Plus communément, la pointe peut servir de source de lumière : grâce à la participation des ondes évanescentes, on peut sonder l'échantillon sur une zone très petite et former une image super-résolue point par point en détectant l'intensité émise ou diffractée en champ lointain [44]. La nécessité d'approcher une pointe à la surface de l'échantillon, combinée à la vitesse limitée des techniques de balayage avec sonde sont les principales limites de ce type de microscopie.

D'autres techniques utilisant les ondes évanescentes sans nécessiter de balayage ont été proposées au cours des dernières années. La plus célèbre est probablement la « lentille parfaite » de Pendry [45]. La théorie prévoit que l'amplitude, exponentiellement décroissante, des ondes évanescentes peut être restaurée lors de leur propagation dans un méta-matériau d'indice optique négatif. Une image « parfaite » est alors formée de l'autre côté de la lentille, en champ lointain. Cette idée a été validée expérimentalement en 2005 sous le nom de « superlentille » [46]. Son utilité pratique est cependant limitée pour deux raisons : la « superlentille » étant plate, le grandissement de l'image obtenue est inexistant, de plus, celle-ci ne peut pas être détectée autrement qu'en champ proche sous peine d'être à nouveau limité par la non-propagation des ondes évanescentes qui la composent. Ces défauts ont été en partie corrigés dans des articles théoriques par un nouveau design de lentilles parfaites courbées [47,48], ou par l'utilisation d'un réseau de diffraction

¹ Regroupées sous l'appellation SNOM (ou parfois NSOM), pour Scanning Near-field Optical Microscopy

transformant une partie des ondes évanescentes en ondes propagatives. « L'hyperlentille », proposée par l'équipe de Zhang [49], a permis d'obtenir expérimentalement une image super-résolue et de grandissement supérieur à 1 dans une direction de l'espace. Les ondes évanescentes porteuses des hautes fréquences transverses sont couplées aux plasmons de surface de couches successives d'aluminium et d'oxyde d'aluminium. Elles se propagent ainsi dans la lentille sans atténuation. La géométrie des couches permet une déviation progressive de ces ondes planes, responsable d'un grossissement optique et de la transformation de certaines des ondes évanescentes en ondes propagatives. Toutefois, il reste nécessaire que l'objet se trouve à « l'intérieur » de la lentille de forme hémicylindrique. Un grandissement isotrope nécessiterait par ailleurs l'utilisation d'une lentille hémisphérique. Enfin, la résolution obtenue expérimentalement (130nm pour $NA=1.4$ et $\lambda=365nm$) n'est au final pas meilleure que celle prévue par la limite de diffraction dans un microscope classique avec une illumination de Köhler ou par un condenseur d'Abbe de grande ouverture numérique.

Pour finir, mentionnons les techniques de réflexion totale interne ([50-52]) et l'illumination structurée assistée par réseau ([53-55]). Elles tirent également parti des propriétés des ondes évanescentes, et seront d'avantage développées dans le dernier chapitre de cette thèse.

I.3.2. Traitement numérique et déconvolution

Nous avons vu précédemment (cf. I.1) que la limite de diffraction se traduit mathématiquement dans l'espace réciproque par une multiplication du spectre de la fonction « objet » par une fonction de transfert qui fait office de filtre passe-bas. Les composantes fréquentielles les plus élevées, multipliées par zéro, sont perdues dans le processus. En microscopie de fluorescence, cette fonction de transfert (que nous avons appelée OTF) est en outre décroissante (cf. Figure I.1.4-a). Les fréquences transmises les plus élevées sont donc d'avantage atténuées que les plus basses. Si cette atténuation est connue, c'est-à-dire si l'on connaît l'OTF, il est possible de rétablir ces fréquences à leur valeur initiale. Pour cela, une simple division dans l'espace de Fourier peut suffire. Il conviendra toutefois de veiller à ne pas reconstruire plus de bruit que de signal : les fréquences les plus

atténuées, *a fortiori* celles qui ont été multipliées par zéro ou des valeurs très petites, peuvent être noyées dans le bruit. On limitera alors la division à un intervalle à l'intérieur duquel les fréquences spatiales restent plus élevées que le niveau du bruit. Ce procédé, que l'on peut appeler déconvolution « linéaire », permet d'améliorer grandement le contraste d'une image et la visibilité des détails qui la composent. En revanche, cela ne change pas la résolution : deux points trop proches pour être résolus ne le seront pas d'avantage après cette opération.

En réalité, les mathématiques montrent qu'il est théoriquement possible d'aller plus loin que cette déconvolution simple. Moyennant l'hypothèse, physiquement raisonnable, que la fonction objet est réelle, positive et définie sur un intervalle borné, on peut montrer que la seule connaissance d'une petite partie de son spectre permet de retrouver l'ensemble de ses autres composantes fréquentielles [56,57]. Cela laisse supposer qu'une résolution infinie peut être atteinte. Malheureusement, la présence de bruit rompt l'unicité de la solution au problème posé, et limite drastiquement la résolution maximale pouvant être atteinte avec une telle approche [57]. Dans ce type de déconvolution non-linéaire et contrainte, les algorithmes utilisés sont généralement itératifs : ils donnent une estimation de la fonction objet qui respecte différentes hypothèses (en particulier la positivité) et qui s'approche de plus en plus des mesures après convolution par la PSF. Certains algorithmes, dits de « déconvolution aveugle », permettent d'estimer la forme de la PSF en même temps que la fonction objet [58-61]. Cette fois encore, ils sont basés sur l'idée qu'il n'y a que deux fonctions (PSF et objet) qui correspondent aux mesures lorsqu'on leur impose un certain nombre de contraintes.

La résolution des images restaurées par déconvolution peut dépasser la limite de diffraction, mais le résultat obtenu dépend généralement du type d'algorithme utilisé et peut contenir des artéfacts [62,63]. La déconvolution reste une technique peu contraignante au niveau expérimental, qui est aujourd'hui très utilisée en microscopie de fluorescence 3D, parfois en complément d'autres techniques (champ large[64,65], confocal [63,66,67], 4Pi [68], I5M [31]), d'avantage pour diminuer le bruit et améliorer le contraste d'une image que pour augmenter sa résolution.

I.3.3. Imagerie point par point : PALM et STORM

Si l'utilisation de contraintes raisonnables, comme la positivité de la densité de fluorescence, permet d'augmenter légèrement la résolution d'une image avec une déconvolution, une contrainte forte permet d'obtenir une amélioration bien plus significative. En considérant que l'objet observé est un émetteur unique, il est en effet possible de déterminer sa position avec une très grande précision, bien meilleure que la limite de résolution imposée par la diffraction [69-71]. La localisation d'une particule fluorescente isolée peut ainsi être considérée comme une déconvolution non-linéaire extrême de son image. Malheureusement, cela n'est pas directement utilisable pour améliorer le pouvoir de résolution de la microscopie de fluorescence: dans la grande majorité des cas, les objets que l'on observe ne sont pas des fluorophores uniques mais des objets étendus, marqués par un grand nombre de molécules très proches les unes des autres. Cette proximité, nécessaire pour « échantillonner » suffisamment l'objet observé, rend l'hypothèse du fluorophore isolé inopérante.

En 2006, trois équipes ont réussi à contourner ce problème, proposant deux techniques très similaires, appelées « STochastic Optical Reconstruction Microscopy » (STORM) [72], « PhotoActivated Localization Microscopy » (PALM) et « Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy » (FPALM) [73]. L'astuce consiste à isoler temporellement les

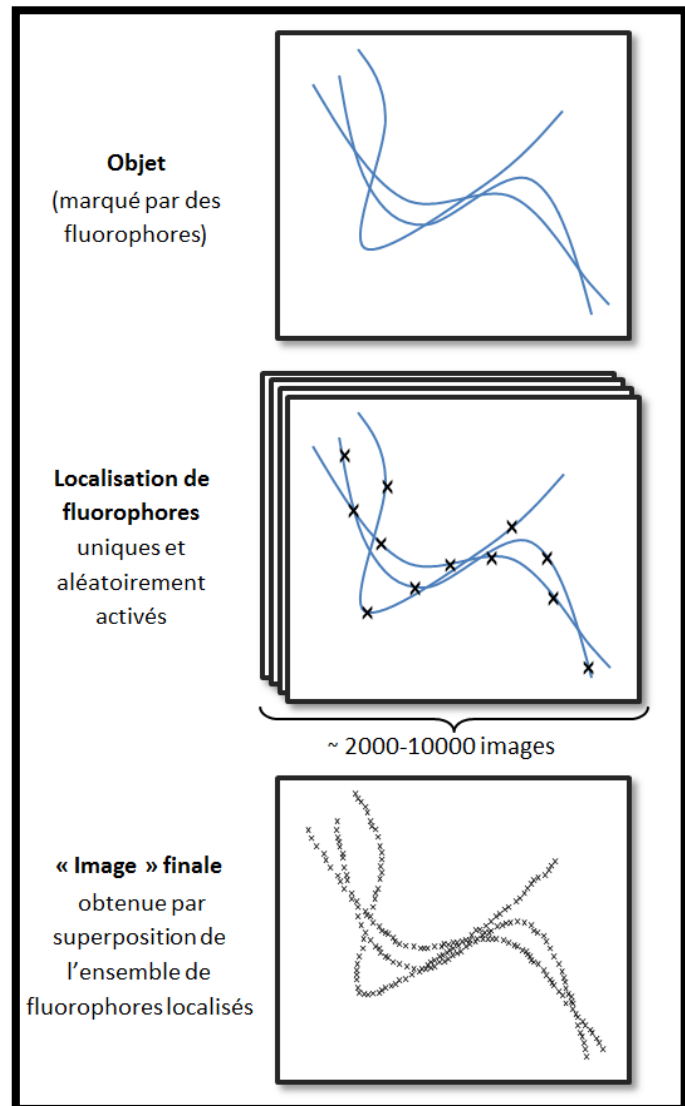


Figure I.3-1 -
Principe des techniques PALM et STORM

nombreux fluorophores qui recouvrent un objet, à défaut de pouvoir le faire spatialement. Pour cela, on utilise des molécules fluorescentes aux propriétés photophysiques particulières. Dans les trois techniques, les marqueurs sont maintenus dans un état sombre, où aucune fluorescence n'est susceptible d'être émise. Un éclairage avec une longueur d'onde spécifique permet de les faire basculer dans un état brillant : c'est la photoactivation. Elles retrouvent alors des propriétés de fluorescence classiques pendant un certain temps, avant d'être à nouveau désactivées, par un photoblanchiment définitif ou en repassant dans l'état sombre. La différence entre les méthodes tient essentiellement au type de molécules utilisées : ce sont des protéines directement photoactivables pour le (F)PALM, alors que le STORM utilise des paires de molécules. Dans ce second cas, une molécule joue le rôle de marqueur fluorescent classique, et l'autre facilite sa « photoactivation » par transfert énergétique. Pour que la méthode fonctionne, il est primordial de contrôler la probabilité avec laquelle un marqueur peut passer de l'état sombre à l'état brillant. Celle-ci dépend des propriétés chimiques des marqueurs et de leur milieu, ainsi que de la puissance de l'impulsion lumineuse d'activation. Ces paramètres sont choisis pour que l'activation simultanée de deux marqueurs trop proches reste un événement rare.

À chaque image, plusieurs fluorophores séparés sont localisés, à l'aide d'une caméra très sensible de type EMCCD. Après l'acquisition de nombreuses d'images (généralement plusieurs milliers), un nombre suffisant de marqueurs ont été repérés pour reconstruire une image de l'objet. Dans ce cas, la résolution de l'image peut être assimilée à la précision de localisation des fluorophores, qui peut théoriquement descendre jusqu'au nanomètre.

Une approche similaire, appelée *PAINT (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography)* a été proposée en 2006 [74]. Cette fois, les fluorophores, qui diffusent librement en solution n'émettent pas de signal : ils sont dans un état énergétique où ils n'absorbent pas les photons d'excitation. C'est seulement en se liant spécifiquement à la surface de l'objet observé qu'ils s'activent et émettent un signal avant d'être définitivement « désactivés » par photo-blanchiment. Si la concentration des marqueurs en solution est bien adaptée, un nombre assez faible de fluorophores s'activent en même temps pour qu'ils puissent être individuellement localisés. Une extension de ce procédé à des marqueurs pouvant diffuser à la surface de l'échantillon a ensuite été publiée sous le nom de *universal PAINT (uPAINT)* [75]. Cette fois, ce n'est plus seulement la position, mais la trajectoire des marqueurs qui est utilisée pour former une image topographique super-

résolue, accompagnée d'informations sur les propriétés de diffusion des différentes zones observées.

En pratique, la localisation d'un fluorophore est assez simple. Son image correspond à la PSF du microscope, échantillonnée par les pixels de la caméra et à laquelle s'ajoute du bruit. Sa position est généralement estimée en faisant correspondre une fonction gaussienne aux données [76]. La précision de cette estimation est définie par l'équation suivante [71] :

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2NA\sqrt{N}} , \quad (I.3-a)$$

où N est le nombre de photons détectés, λ leur longueur d'onde et NA l'ouverture numérique de l'objectif utilisé. Cette équation n'est valable qu'en négligeant l'erreur causée par la pixellisation de l'image¹ et le bruit de fond². En fixant un nombre minimum de photons détectés pour prendre en compte la localisation d'un fluorophore, il est possible de fixer la limite de résolution de l'image obtenue. À titre d'exemple, 10 000 photons détectés permettent d'obtenir une précision d'environ 2nm, alors que 400 photons la font redescendre à 10-20 nm [77]. Toutefois, cela suppose que certains fluorophores sont simplement négligés s'ils n'ont pas émis un nombre suffisant de photons au cours de l'acquisition. Plusieurs milliers d'images sont généralement nécessaires pour localiser un nombre suffisant de fluorophores et reconstituer une image satisfaisante de l'objet. En partant de ce constat, on comprend que le gain de résolution se fait au détriment de la vitesse d'imagerie, ce qui constitue probablement la plus grande limite de ce type de méthode. Actuellement, une résolution de 60nm nécessite un temps d'acquisition d'environ 25 secondes [78]. De nombreux efforts ont été réalisés depuis la publication des premiers articles, pour développer de nouveaux marqueurs plus performants, multipliant les champs d'application et l'efficacité de ces trois méthodes [79-81].

Notons enfin que le principe a été étendu à l'imagerie 3D. Pour cela, on distingue plusieurs idées. La première est d'utiliser les interférences qui se forment entre les deux images d'un même fluorophore à travers deux objectifs opposés, dans une configuration de type 4Pi [82,83]. Une deuxième consiste à modifier la forme de la PSF le long de l'axe optique. On peut pour cela lui ajouter un fort astigmatisme avec une lentille cylindrique

¹ La taille des pixels doit pour cela être inférieure à environ la moitié de la PSF, cf. [71]

² Le bruit de fond, principalement causé par l'électronique du capteur et sa température, est très faible avec les caméras EMCCD refroidies.

[84,85] ou même en lui donner une forme de double hélice à l'aide d'un modulateur spatial de lumière (SLM) [86]. Une troisième proposition est de comparer l'image obtenue simultanément sur deux plans différents, pour en déduire la position axiale du fluorophore[87].

I.3.4. Utilisation des phénomènes non-linéaires

La limite de diffraction limite la quantité d'information fréquentielle transmise par le microscope. L'utilisation d'un éclairage spécifique permet d'obtenir en fluorescence des résolutions jusqu'à deux fois meilleures que celle prévue par la limite d'Abbe, mais la diffraction agissant également sur l'éclairage, il semble impossible de dépasser ce facteur deux. L'imagerie point par point vue précédemment, sorte de déconvolution ultime, permet d'aller encore plus loin ; elle reste une technique nécessitant la prise de milliers d'images, donc très lente. D'autres techniques se sont montrées capable d'obtenir des résolutions comparables, en utilisant une autre voie : celle des non-linéarités [88].

Le terme de « non-linéarités » désigne ici une relation non-linéaire entre l'éclairage de l'objet et sa réponse optique, de sorte que l'image obtenue peut s'écrire sous la forme suivante :

$$\begin{aligned} f_{image}(\mathbf{r}) &= [g(f_{ill}(\mathbf{r})) \times f_{obj}(\mathbf{r})] * PSF(\mathbf{r}), \\ &= [F_{ill}(\mathbf{r}) \times f_{obj}(\mathbf{r})] * PSF(\mathbf{r}). \end{aligned} \quad (I.3-b)$$

$$\text{ou} \quad \tilde{f}_{image}(\mathbf{k}) = [\tilde{F}_{ill}(\mathbf{k}) * \tilde{f}_{obj}(\mathbf{k})] \times OTF(\mathbf{k})$$

Cette équation correspond aux équations (1.2-e) et (1.2-f) obtenues précédemment, auxquelles on ajoute une composition de la fonction d'illumination par une fonction g non-linéaire. De cette manière, le spectre de la fonction d'illumination effective F_{ill} n'est plus nécessairement limité par la diffraction de la lumière. Pour s'en convaincre, il suffit d'écrire le développement en série de Taylor de la fonction g au voisinage de 0 :

$$g(x) = \sum_{n=0}^{\infty} a_n (x)^n \quad (I.3-c)$$

$$\text{avec} \quad a_n = \frac{g^{(n)}(0)}{n!}, \quad (I.3-d)$$

ce qui permet d'écrire la fonction d'illumination effective sous la forme suivante :

$$F_{ill}(\mathbf{r}) = g(f_{ill}(\mathbf{r})) = \sum_{n=0}^{\infty} a_n f_{ill}(\mathbf{r})^n \quad (1.3-e)$$

À la condition que a_n (*i.e.* que la n -ième dérivée de g en 0) ne soit pas nul, alors le n -ième terme de cette série comprend des composantes spectrales jusqu'à n fois plus grandes que celles qui composent f_{ill} . Ce résultat découle simplement du théorème de convolution : la transformée de Fourier de f_{ill}^n est égale à n convolutions de la transformée de Fourier de f_{ill} avec elle-même. Or, la convolution d'une fonction f_0 dont le support est limité à un intervalle $[-k_0; k_0]$ par une fonction f_1 dont le support est limité à un autre intervalle $[-k_1; k_1]$ donne une fonction de support $[-(k_0+k_1); (k_0+k_1)]$. Ainsi, si la plus haute fréquence¹ que contient f_{ill} est k_{max} , alors f_{ill}^n peut contenir des fréquences allant jusqu'à nk_{max} .

On remarquera que si g est un polynôme d'ordre N , alors tout terme de la série de Taylor supérieur à N est nul. Par conséquent, le gain de fréquences spatiales est intrinsèquement limité à Nk_{max} . La microscopie à deux photons [89], en est une bonne illustration. Dans cette technique, la transition énergétique nécessaire à l'excitation des marqueurs utilisés est deux fois plus grande que l'énergie de photons employés pour éclairer l'échantillon. L'absorption simultanée de deux photons est donc requise. Si, f_{ill} est la probabilité (proportionnelle à l'intensité lumineuse incidente) d'absorption d'un photon à une position donnée, la probabilité d'en absorber deux est bien donnée par f_{ill}^2 . Le gain en résolution obtenu est cependant plus qu'annulé par la nécessité d'utiliser une longueur d'onde d'excitation deux fois plus grande. La microscopie à deux photons (et plus généralement à m photons) n'est pas une technique efficace pour améliorer la résolution d'un microscope.

En revanche, si g n'est pas polynomiale, sa série de Taylor est infinie, et peut contenir des fréquences arbitrairement élevées. Par exemple, les effets de saturation s'expriment généralement par une fonction de type exponentielle, et donc non-polynomiale. De manière générale, dans le cas simple d'un modèle à deux états énergétiques (excité/non-excité), le flux photonique de fluorescence à l'équilibre d'un fluorophore unique, suit une loi de la forme [21,90] :

¹ k_{max} est déterminé dans notre cas par la longueur d'onde et l'ouverture numérique utilisées pour l'éclairement (*cf.* parties I.2.3 et I.2.2).

$$g(I) \propto I \times \frac{Q_{em} k_r}{I + \frac{k_r}{\sigma}} \quad (1.3-f)$$

où I est l'intensité lumineuse incidente, σ est la section efficace d'absorption des photons du fluorophore considéré, k_r est le taux de relaxation (radiative et non-radiative) de son état excité, et Q_{em} est son rendement quantique d'émission. Généralement, I est bien inférieur à k_r/σ , et $g(I)$ dépend linéairement de I . En revanche, lorsque ce n'est plus le cas, un régime de saturation apparaît. La fonction g n'est plus linéaire et contient donc des harmoniques élevées de la fonction I .

La microscopie à éclairage structurée saturé [90-92] (*Saturated Structured Illumination Microscopy*) applique directement ce principe à l'éclairage structuré « standard » : l'échantillon est éclairé par une grille de lumière périodique afin de récupérer par effet de Moiré des zones du spectre de Fourier situées en dehors de la bande passante définie par la limite de diffraction. Mais cette fois, les harmoniques d'ordres supérieurs créés par l'effet de saturation permettant, après un traitement adéquat, d'atteindre des parties encore plus éloignées du spectre de la densité de fluorophores. Cette technique reste cependant limitée en pratique car elle requiert un grand nombre d'images avec différentes positions de la grille pour que l'inversion des données se fasse correctement. Combiné à la puissance importante requise pour atteindre le régime de saturation, cela provoque un photoblanchiment et/ou une photo-toxicité rédhibitoire pour la plupart des échantillons.

La microscopie *STED* (*STimulated Emission Depletion Microscopy*) [93,94] repose aussi sur ce type de non-linéarité, mais c'est cette fois la transition inverse qui est saturée : le niveau excité est vidé en forçant la relaxation par émission stimulée. Comme dans un microscope confocal, un premier faisceau vient peupler le niveau excité de fluorophores situés sur une zone dont la taille est donnée par la limite de diffraction. On utilise ensuite un second faisceau, que l'on focalise selon un mode particulier qui donne un zéro d'intensité au milieu du spot. Les fluorophores excités par le premier faisceau sont stimulés par le second faisceau, sauf dans la zone centrale où son intensité est nulle. Le signal stimulé est filtré spectralement, ainsi, seuls les fluorophores à la fois excités et non stimulés participent à la formation de l'image finale.

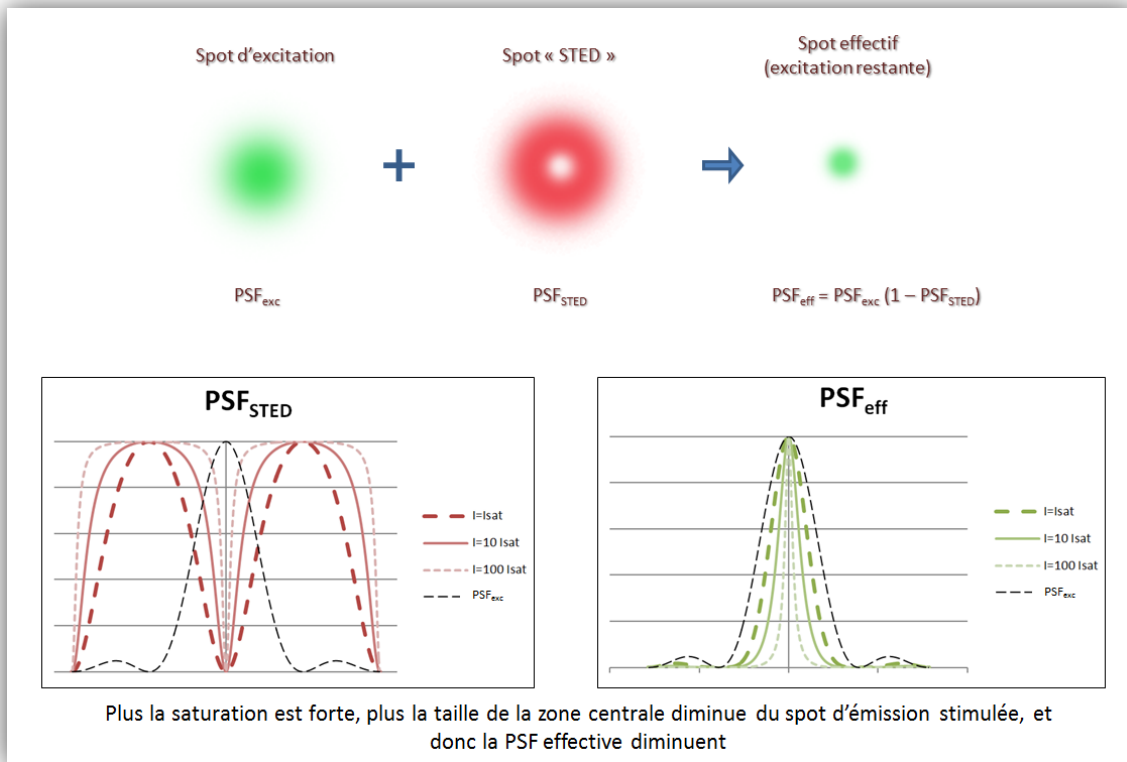


Figure I.3-2 : Principe de la microscopie STED

La saturation de l'émission stimulée est primordiale pour faire apparaître des fréquences spatiales très élevées dans le spot de déplétion. Sans celle-ci, la forme du spot de déplétion resterait limitée par la diffraction et la zone centrale aurait une taille minimum d'environ $0.5\lambda/NA$. Dans ces conditions, la résolution d'un microscope *STED* ne serait qu'environ deux fois meilleure que celle d'un microscope confocal classique, exactement comme celle de la obtenue en illumination structurée par rapport au champ large classique. En théorie, une puissance infinie permet d'obtenir une résolution infinie. En pratique, l'augmentation de la puissance incidente reste fortement limitée par la photo-toxicité et le photo-blanchiment qui l'accompagnent. La résolution que l'on trouve habituellement dans la bibliographie pour des applications biologiques, sur des échantillons marqués par des fluorophores relativement stables, est proche de 50nm [95,96].

Il est également possible d'utiliser la saturation temporelle de l'émission de la fluorescence pour améliorer la résolution d'un microscope confocal. En excitant l'échantillon avec un laser focalisé, modulé à 10 KHz et couplé avec une détection synchrone, on peut ainsi obtenir une PSF effective de taille réduite [97,98].

Enfin, en microscopie de diffraction, le phénomène de diffusion multiple donne également une relation non-linéaire entre l'éclairement et le champ diffracté par un objet. Nous montrerons dans le prochain chapitre que cela permet d'améliorer significativement la résolution d'une technique comme la tomographie optique de diffraction, pour des échantillons de forte permittivité diélectrique.

Chapitre II. Super-résolution par tomographie optique de diffraction

Résumé du chapitre

Dans ce chapitre, nous présentons une technique d'imagerie sans marqueurs, la microscopie tomographique de diffraction, qui permet d'obtenir la carte de permittivité d'un échantillon avec une résolution bien meilleure que les microscopes classiques. Cette technique consiste à mesurer, à l'aide d'un montage interférométrique, le champ diffracté par l'échantillon sous différents éclairagements et à résoudre le problème inverse pour estimer la carte de permittivité. Dans tout ce chapitre nous nous restreignons à l'étude d'échantillons invariants selon une direction de l'espace.

Dans un premier temps, nous complétons le modèle de la diffraction d'une onde plane par un objet volumique proposé dans le chapitre précédent pour l'adapter à nos conditions expérimentales. Nous étudions tout particulièrement l'influence de la diffusion multiple sur le champ diffracté et ses conséquences sur le processus d'imagerie. Une méthode d'inversion qui prend en compte le phénomène de diffusion multiple est alors présentée. Après avoir détaillé le dispositif expérimental, les étapes de calibration et de normalisation de données, nous présentons des résultats mettant en évidence l'intérêt de notre méthode d'inversion par rapport à celles qui utilisent l'approximation de diffusion simple (approximation de Born). Enfin, nous montrons que, grâce au phénomène de diffusion multiple, notre algorithme est capable de reconstruire la carte de permittivité de certains échantillons fortement diffractant avec une résolution bien meilleure que le critère d'Abbe.

Introduction

La tomographie optique de diffraction est une forme dérivée de la microscopie holographique numérique (Digital Holography Microscopy [99]), qui consiste à reconstruire l'image d'un échantillon à partir de l'enregistrement numérique d'hologrammes [100]. Ces hologrammes sont généralement obtenus par l'interférence d'un champ de référence avec le champ diffracté ou réfléchi par l'objet observé.

Contrairement à la microscopie conventionnelle [14], cette approche permet d'obtenir une information quantitative sur l'objet, en particulier sa permittivité diélectrique ou son indice optique [101,102]. Cela peut s'avérer utile pour caractériser par exemple l'état d'échantillons biologiques [103-105], les aberrations que leurs variations d'indice optique créent [103], ou les différents éléments d'un composant de micro-électronique. La tomographie optique de diffraction ajoute à cela la combinaison des informations obtenues avec plusieurs angles d'illumination

successifs, ce qui permet d'améliorer la résolution de l'image obtenue dans les trois dimensions [106], par synthèse d'ouverture (cf. I.2.2, p33). De nombreuses configurations expérimentales ont été proposées pour mettre en pratique cette idée [107-110].

Reconstruire une image quantitative d'un échantillon à partir des hologrammes mesurés nécessite de passer par un algorithme d'inversion. Pour simplifier cette étape, on peut supposer que le champ électromagnétique qui s'établit à l'intérieur de l'échantillon est très peu perturbé par le champ que celui-ci diffracte. On utilise alors un modèle où le champ total dans l'objet est identique à ce qu'il serait sans la présence de cet objet : c'est l'approximation de Born de premier ordre. Cette hypothèse est raisonnable pour des échantillons faiblement diffractants, c'est-à-dire dont le contraste de permittivité avec leur milieu environnant (air, eau, huile...) est faible. Dans ce cas, la modèle de diffraction devient linéaire [29]: lorsque l'objet est éclairé par une onde plane, l'amplitude de chaque onde

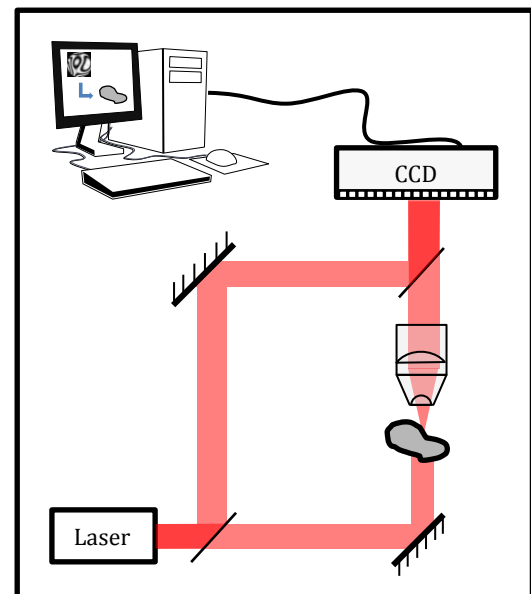


Figure I.3.4-1 - Schéma de principe de la microscopie holographique numérique

diffractée dans une direction particulière en champ lointain (donnée par un α_{det}) est proportionnelle à une composante particulière de la transformée de Fourier 3D du contraste de permittivité de l'objet ($\widetilde{\Delta\epsilon}(\alpha_{det} - \alpha_{inc})$). La tomographie optique de diffraction tire profit du fait que cette relation dépend de la direction de l'onde plane éclairante (donnée par α_{inc} ¹), en utilisant plusieurs directions différentes, dans le but d'accéder aux valeurs de $\widetilde{\Delta\epsilon}$ sur un domaine élargi. Cette synthèse d'ouverture permet d'atteindre des fréquences latérales de $2k_0NA/(2\pi)^2$ (cf. Figure 1.2-3). Pour des échantillons de permittivité élevée, en revanche, l'approximation de Born n'est

plus valable, et il est nécessaire d'utiliser une modélisation rigoureuse du phénomène de diffraction. C'est ce qui constitue la principale force et originalité des travaux que nous allons présenter dans ce chapitre.

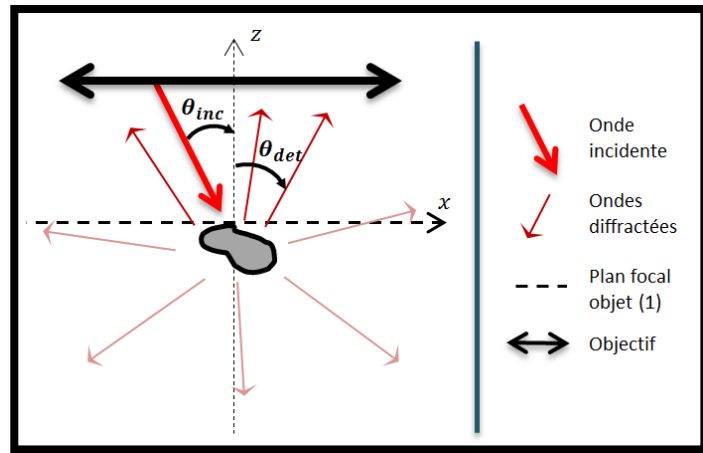


Figure 0-2 : Principe de la tomographie optique de diffraction.

On collecte une partie du champ diffracté par un objet, lorsque celui-ci est éclairé par une onde plane et pour plusieurs incidences (θ_{inc}) successives

II.1. Modélisation théorique rigoureuse du problème direct

Le problème direct consiste à trouver le champ diffracté par un échantillon connu, lorsque celui-ci est éclairé par un champ de référence. Représentant le champ électrique qui existe en l'absence d'objet. Pour simplifier le problème et montrer la validité de notre approche, nous nous sommes restreints dans les travaux présentés ici au cas d'objets invariants selon

¹ $\alpha_{inc} = -nk_0\sin(\theta_{inc})$, de même que $\alpha_{det} = nk_0\sin(\theta_{det})$. La différence de signe vient du sens opposé des ondes incidentes et détectées (cf. figure ci-dessus)

² En considérant que les ouvertures numériques sont égales pour l'éclairage et la détection

une direction de l'espace (Oy), et éclairés en polarisation s (TE). Ainsi, le champ électrique est toujours dirigé dans cette direction d'invariance, et nous le décrirons pas un scalaire : $\vec{E}(\mathbf{r}) = E(\mathbf{r})\vec{y}$. Le problème sera décrit dans un espace 2D, où chaque point de coordonnées (x_0, z_0) correspond dans l'espace réel 3D à une droite d'équation $(x = x_0 \text{ et } z = z_0)$. L'extension au cas tridimensionnel, qui requiert une analyse vectorielle, est actuellement traitée par notre équipe dans le cadre d'une autre thèse commencée en 2009.

II.1.1. Modélisation rigoureuse du problème direct : approche non-linéaire

Champ proche

Les calculs effectués dans le premier chapitre supposaient que l'objet était « suspendu » dans le vide. Dans nos expériences, celui-ci est posé sur un substrat et il peut être immergé dans un milieu dont la permittivité diélectrique est différente de celle du vide (eau, huile...). Cette configuration est décrite par la permittivité relative $\varepsilon_{ref}(z)$ suivante:

$$\varepsilon_{ref}(z) = \begin{cases} \varepsilon_1 & \text{pour } z > z_{interf} \\ \varepsilon_2 & \text{pour } z < z_{interf} \end{cases}, \quad (\text{II.1-a})$$

où z_{interf} donne la position de l'interface entre les deux milieux par rapport au plan focal objet. Dans nos expériences, l'éclairement correspond à une onde plane incidente d'amplitude unitaire (i.e. normalisée) qui se propage vers les z négatifs : nous sommes dans une configuration en réflexion (épi) et l'axe (Oz) est dirigé vers l'objectif. Le plan focal objet (d'équation $z=0$) est situé dans le milieu 1, au-dessus de l'objet. Dans ce cas, Le champ de référence,

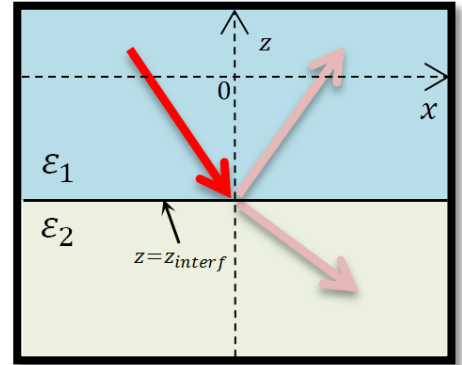


Figure II.1.1-a : Géométrie du système de référence (sans objet)

formé par une onde plane envoyée vers le substrat depuis le milieu 1 s'écrit alors :

$$E_{ref}^{(1)}(x, z) = \begin{cases} e^{i(\alpha_{inc}x - \Gamma_1(\alpha_{inc})z)} + r_{1,2}(e^{i(\alpha_{inc}x + \Gamma_1(\alpha_{inc})z)} & \text{pour } z > z_{interface} \\ t_{1,2}e^{i(\alpha_{inc}x - \Gamma_2(\alpha_{inc})z)} & \text{pour } z < z_{interface} \end{cases} \quad (\text{II.1-b})$$

$$\text{avec} \quad \Gamma_i(\alpha) = \sqrt{\varepsilon_i k_0^2 - \alpha^2} \quad (\text{II.1-c})$$

r et t sont les coefficients de Fresnel de réflexion et de transmission en mode TE définis par[19] :

$$\begin{aligned} r_{i,j} &= e^{-i2\Gamma_i(\alpha)z_{interf}} \frac{\Gamma_i(\alpha) - \Gamma_j(\alpha)}{\Gamma_i(\alpha) + \Gamma_j(\alpha)} \\ t_{i,j} &= e^{i(\Gamma_i(\alpha) - \Gamma_j(\alpha))z_{interf}} \frac{2\Gamma_i(\alpha)}{\Gamma_i(\alpha) + \Gamma_j(\alpha)} \end{aligned} \quad (\text{II.1-d})$$

Nous distinguons deux configurations : soit l'objet est situé dans le milieu 1 (cas 1), soit il est de l'autre côté de l'interface (cas 2).

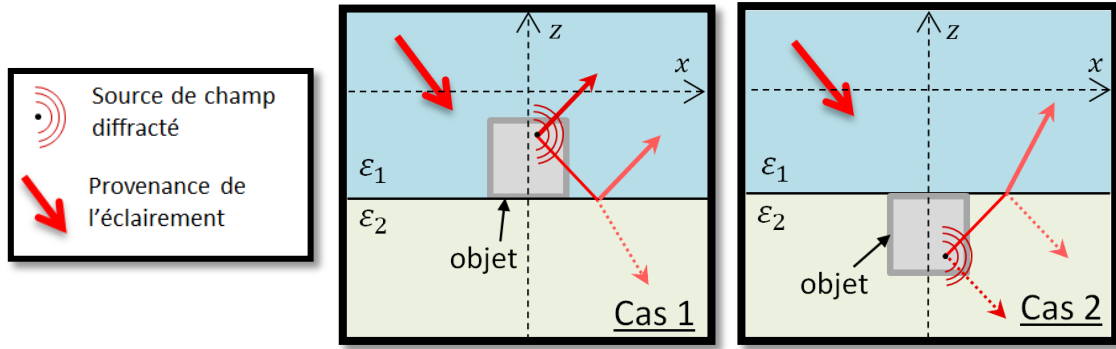


Figure II.1.1-b : Placement de l'objet par rapport au substrat

Dans les deux cas, nous avons ($\Delta\epsilon(x, z) = 0$ si $z < 0$), puisque le plan focal objet est situé juste au-dessus de l'objet. La fonction de Green doit être calculée pour résoudre ces deux cas, en prenant en compte la nouvelle expression de $\epsilon_{ref}(z)$.

Elle prend alors les formes suivantes [111] :

-Pour z et $z' < z_{interf}$,

$$G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \frac{1}{4i\pi} \int \frac{1}{\Gamma_2(\alpha)} \left(e^{i(\alpha(x-x') + \Gamma_2(\alpha)|z-z'|)} + r_{2,1} e^{i(\alpha(x-x') - \Gamma_2(\alpha)(z+z'))} \right) d\alpha. \quad (\text{II.1-e})$$

-Pour z et $z' > z_{interf}$,

$$G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \frac{1}{4i\pi} \int \frac{1}{\Gamma_1(\alpha)} \left(e^{i(\alpha(x-x') + \Gamma_1(\alpha)|z-z'|)} + r_{1,2} e^{i(\alpha(x-x') + \Gamma_1(\alpha)(z+z'))} \right) d\alpha. \quad (\text{II.1-f})$$

-Et enfin, pour $z > z_{interf}$ et $z' < z_{interf}$,

$$G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \frac{1}{4i\pi} \int \frac{1}{\Gamma_2(\alpha)} t_{2,1} e^{i(\alpha(x-x') + \Gamma_1(\alpha)z - \Gamma_2(\alpha)z')} d\alpha. \quad (\text{II.1-g})$$

Une fois ces fonctions définies, pour calculer le champ diffracté par l'objet, nous pouvons reprendre l'expression du champ électrique total qui règne à l'intérieur et autour de l'objet éclairé, calculée dans le chapitre précédent (équation (I.1-w)) :

$$\begin{aligned} E_{tot}^{(1)}(x, y) &= E_{ref}(x, y) + E_d(x, y) \\ &= E_{ref}(\mathbf{r}) + \iint G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \Delta\epsilon(\mathbf{r}') k_0^2 E_{tot}^{(1)}(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'. \end{aligned} \quad (\text{II.1-h})$$

Puisque $\Delta\epsilon(\mathbf{r})$ est supposé connu dans le problème direct, il nous reste maintenant à calculer $E_{tot}^{(1)}(x, y)$ pour retrouver le champ diffracté à partir de cette équation. Pour résoudre ce problème numériquement, nous définissons un domaine restreint Ω de l'espace 2D, à l'intérieur duquel se trouve l'objet. Le contraste de permittivité en dehors de ce domaine est donc nul. Ω est discrétisé en un nombre fini $N (= N_x \times N_y)$ d'éléments de surface $\Delta x \Delta z$, à l'intérieur desquels le champ est supposé homogène. Pour que cette hypothèse soit raisonnable, il convient de choisir un maillage suffisamment fin par rapport aux variations du contraste de permittivité et du champ électrique. Typiquement, nous choisirons une maille de taille inférieure à $\lambda_0 / (10\sqrt{\epsilon_{max}})$, où ϵ_{max} est la valeur maximale attendue de la permittivité relative dans l'objet. On obtient une formulation discrète du champ pour chaque point de la maille :

$$\begin{aligned} E_{tot}^{(1)}(x_i, z_j) &= E_{ref}(x_i, z_j) \\ &+ \sum_{i'}^{N_x} \sum_{j'}^{N_z} \iint_{-\Delta x/2, -\Delta z/2}^{\Delta x/2, \Delta z/2} G(x_i, x_{i'} + u, z_j, z_{j'} + v) \Delta\epsilon(x_{i'}, z_{j'}) k_0^2 E_{tot}^{(1)}(x_{i'}, z_{j'}) du dv \end{aligned} \quad (\text{II.1-i})$$

Nous avons alors un système de N équations à N inconnues qu'il est possible de résoudre rigoureusement, pour retrouver le champ à l'intérieur de l'objet. Par la suite, nous utiliserons une notation symbolique, en réécrivant l'équation de la manière suivante :

$$E_{tot,l} = E_{ref,l} + \mathbf{G}\chi E_{tot,l} \quad \text{pour } l = 1..L \quad (\text{II.1-j})$$

χ donne le contraste de permittivité dans chacune des mailles du domaine Ω . L'indice l fait référence à un éclairage donné, parmi les L considérés. À chaque éclairage correspond un angle d'incidence $\theta_{inc,l}$ définissant le $\alpha_{inc,l} (= \sqrt{\epsilon_{r1}} k_0 \sin \theta_{inc,l})$ de l'équation (II.1-b). L'opérateur est donc un opérateur de convolution

Champ lointain

En pratique, le champ électrique diffracté est capté en champ lointain, en plaçant un détecteur dans un plan conjugué au plan focal arrière de l'objectif. Nous avons vu dans la section I.1.2 (équation (I.1-m), p17) que l'on mesure dans ce plan la transformée de Fourier 2D du champ formé dans le plan focal objet ($z=0$) par des ondes planes se propageant vers l'objectif (*i.e.* vers les $z>0$) :

$$E^{(2)}(x) \propto \widetilde{E}^{(1)}\left(\alpha = \frac{xk}{f}\right), \quad (\text{II.1-k})$$

où k est le nombre d'onde dans le milieu (1). Le champ total correspond à la somme du champ de référence et du champ diffracté par l'objet. Autour de l'angle de détection correspondant à l'angle d'incidence (*i.e.* pour $\theta_{inc} \approx \theta_{det}$, cf. Figure I.1-3), le champ détecté correspond principalement à la réflexion spéculaire du faisceau incident, tandis que pour les autres angles, c'est principalement le champ diffracté qui détermine la valeur que l'on mesure. Puisque c'est le champ diffracté qui porte une information sur l'objet, nous ne nous intéresserons par la suite qu'à sa seule contribution.

Pour connaître les valeurs de $\widetilde{E}_d^{(1)}(\alpha_{det})$ pour les différents α_{det} auxquels nous avons accès ($\alpha_{det} \in [-k_0 NA; +k_0 NA]$), nous partons de l'expression de $E_d(x, z)$ donnée par l'équation (II.1-h)

$$E_d^{(1)}(x, z) = \iint G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \Delta \varepsilon(\mathbf{r}') k_0^2 E_{tot}^{(1)}(\mathbf{r}') d\mathbf{r}' \quad (\text{II.1-l})$$

Dans le cas 1, où le contraste de permittivité est non nul uniquement pour $z' < z_{interf}$, nous utilisons uniquement l'expression de G donnée par l'équation (II.1-f):

$$E_d^{(1)}(x, 0) = \iint \frac{1}{4i\pi} \left[\frac{1}{\Gamma_1(\alpha)} \left(e^{i(\alpha(x-x')\Gamma_1(\alpha)|0-z'|)} + r_{1,2} e^{i(\alpha(x-x')\Gamma_1(\alpha)(0+z'))} \right) d\alpha \right] \times \Delta \varepsilon(\mathbf{r}') k_0^2 E_{tot}^{(1)}(\mathbf{r}') d\mathbf{r}', \quad (\text{II.1-m})$$

ce qui peut se réécrire ainsi :

$$E_d^{(1)}(x, 0) = \frac{1}{2\pi} \int \widetilde{E}_d^{(1)}(\alpha) e^{i\alpha x} d\alpha \quad (\text{II.1-n})$$

avec
$$\widetilde{E}_d^{(1)}(\alpha) = \iint k_0^2 E_{tot}^{(1)}(\mathbf{r}') \Delta \varepsilon(\mathbf{r}') K(\alpha, x', z') dx' dz' \quad (\text{II.1-o})$$

et
$$K(\alpha, x', z') = \frac{-i}{2\Gamma_1(\alpha)} \iint e^{-i\alpha x'} \left(e^{i\Gamma_1(\alpha)z'} + r_{1,2} e^{i\Gamma_1(\alpha)z'} \right) dx' dz'. \quad (\text{II.1-p})$$

Comme on peut le remarquer, les ondes réfléchies par le substrat contribuent dans ce cas au champ mesuré. Cela apporte des informations supplémentaires sur l'objet, améliorant en particulier la résolution en z^1 .

Dans le cas 2, c'est l'équation (II.1-g) que nous utilisons pour obtenir l'expression de G puisque $\Delta\epsilon(\mathbf{r}')$ est nul pour tout $z' > 0$ et que le champ est toujours capté du côté des $z > 0$:

$$E_d^{(1)}(x, 0) = \iint \frac{1}{4i\pi} \left[\int \frac{1}{\Gamma_1(\alpha)} t_{2,1} e^{i(\alpha(x-x') - \Gamma_2(\alpha)(z_{int} + z'))} d\alpha \right] \Delta\epsilon(\mathbf{r}') k_0^2 E_{tot}^{(1)}(\mathbf{r}') d\mathbf{r}', \quad (\text{II.1-q})$$

ce qui donne

$$E_d^{(1)}(x, 0) = \frac{1}{2\pi} \int \widetilde{E}_d^{(1)}(\alpha) e^{i\alpha x} d\alpha \quad (\text{II.1-r})$$

avec
$$\widetilde{E}_d^{(1)}(\alpha) = \iint k_0^2 E_{tot}^{(1)}(x', z') \Delta\epsilon(x', z') K(\alpha, x', z') dx' dz' \quad (\text{II.1-s})$$

et
$$K(\alpha, x', z') = \frac{-i}{2\Gamma_2(\alpha)} t_{2,1} e^{-i(\alpha x' - \Gamma_2(\alpha) z')}. \quad (\text{II.1-t})$$

Cette fois encore, nous utiliserons par la suite une notation symbolique pour décrire le champ lointain par rapport au champ proche :

$$E_{d,l}^{(2)} = \mathbf{K} \chi E_{tot,l} \quad \text{pour } l = 1 \dots L. \quad (\text{II.1-u})$$

$E_{d,l}^{(2)}$ correspond ici aux $\widetilde{E}_d^{(1)}(\alpha)$ collectés et \mathbf{K} est l'opérateur qui lie ceux-ci au contraste de permittivité et au champ total. Son expression est donnée, selon les cas, par les équations (II.1-o) et (II.1-p) ou (II.1-s) et (II.1-t).

En observant les expressions de \mathbf{K} , on peut constater que cet opérateur est un opérateur de transformée de Fourier : le champ détecté dans le plan (2) correspond² à la somme des transformées de Fourier de $(E_{tot}^{(1)} \times \Delta\epsilon)$ en $(\alpha, \Gamma_1(\alpha))$ et $(\alpha, -\Gamma_1(\alpha))$ (cas 1) ou seulement en $(\alpha, \Gamma_2(\alpha))$ (cas 2). Les valeurs de α sont limitées par l'ouverture numérique de l'objectif de collection.

¹ Mais pas en x , car les ondes réfléchies ont la même composante α que les ondes directement collectées

² Avec une éventuelle pondération par un coefficient de transmission ou réflexion selon les cas

II.1.2. Diffusion multiple et conséquences sur la limite de diffraction.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que, dans le cadre de l'approximation de Born, la synthèse d'ouverture opérée en combinant les champs diffractés par un échantillon éclairé sous plusieurs angles successifs reste fondamentalement bornée par l'ouverture numérique utilisée (cf. Figure I.2-3). Par la suite, nous avons mentionné des techniques qui permettent de franchir cette limite de la diffraction en utilisant les ondes évanescentes, à condition d'avoir une source ou un détecteur suffisamment proche de l'objet pour cela (cf. section I.3.1). La possibilité d'exploiter une relation non-linéaire entre la fonction d'illumination et la « réponse » de l'objet a également été évoquée (cf. section I.3.4). Comme nous allons le voir, le phénomène de diffusion multiple correspond justement à un phénomène non linéaire, et peut faire intervenir les ondes évanescentes. À ce titre, nous voulons montrer qu'il est susceptible d'améliorer la résolution des reconstructions de $\Delta\epsilon(\mathbf{r})$ (χ).

Nous rappelons que le champ diffracté par un objet décrit par le contraste de permittivité χ , et capté en champ lointain est donné par l'équation suivante :

$$E_d^{(2)} = \mathbf{K}\chi E_{tot}, \quad (\text{II.1-v})$$

tandis qu'en champ proche, il s'écrit :

$$E_d^{(1)} = \mathbf{G}\chi E_{tot}. \quad (\text{II.1-w})$$

Sous l'approximation de Born du premier ordre, le champ total est remplacé dans ces équations par le champ de référence, obtenu en l'absence de d'objet diffractant, et généralement connu. Nous avons vu que l'opérateur \mathbf{K} correspondait (grossièrement) à une transformée de Fourier du produit χE_{tot} (remplacé par χE_{ref} sous Born), effectuée sur un domaine borné par l'ouverture numérique de détection. Par un effet de Moiré, la multiplication des deux termes nous permet d'avoir accès à des composantes de $\tilde{\chi}$ (i. e. $\tilde{\Delta\epsilon}$) au-delà de l'ouverture numérique de détection, mais toujours sur un intervalle borné, car le support de E_{ref} est lui-même limité.

Lorsque l'objet observé est décrit par un fort contraste de permittivité, l'approximation de Born n'est plus valable, et le champ total dans les équations (II.1-v) et (II.1-w) doit être déterminé rigoureusement à partir de la relation (II.1-j) :

$$E_{tot} = E_{ref} + E_d^{(1)} = E_{ref} + \mathbf{G}\chi E_{tot}. \quad (\text{II.1-x})$$

En insérant l'équation (II.1-x) dans (II.1-w) une infinité de fois, nous pouvons le réécrire sous la forme du développement suivant :

$$E_{tot} = \sum_{i=0}^{\infty} E_{d,i}^{(1)} \quad (\text{II.1-y})$$

$$\text{avec} \quad E_{d,i}^{(1)} = \mathbf{G}\chi E_{d,i-1}^{(1)} \quad (\text{II.1-z})$$

$$\text{et} \quad E_{d,0}^{(1)} = E_{ref} \quad (\text{II.1-aa})$$

Dans cette série, les termes $E_{d,i}$ correspondent à i diffractions successives du champ de référence par l'objet. Sous l'approximation de Born du premier ordre, seul le premier terme (E_{ref}) est utilisé pour calculer le champ diffracté, les autres sont considérés négligeables car χ est supposée très faible. En régime de diffusion multiple en revanche, le champ de référence diffracté de « multiples » fois contribue de manière non négligeable au champ total. Arrêtons-nous au second terme ($i=1$) de la série :

$$E_{d,1} = \mathbf{G}\chi E_{ref}. \quad (\text{II.1-bb})$$

Le théorème de convolution indique que la transformée de Fourier de χE_{ref} est donnée par la convolution de $\tilde{\chi}$ et \tilde{E}_{ref} . En conséquence, si l'objet (χ) contient des fréquences élevées, c'est-à-dire si le support de $\tilde{\chi}$ est très large, alors celui de $\tilde{\chi}\tilde{E}_{ref}$ peut l'être d'avantage encore. L'opérateur \mathbf{G} correspond à un terme de convolution et de propagation des ondes. S'il fait office de filtre passe-bas à grande distance, ce n'est pas le cas en champ proche, et par conséquent, $E_{d,1} = \mathbf{G}\chi E_{ref}$ peut contenir des fréquences aussi élevées que χE_{ref} . La transformée de Fourier du champ total n'est alors plus fondamentalement bornée par la limite de diffraction. En conséquence, l'effet de Moiré appliqué à l'équation (II.1-v) devrait permettre de récupérer des fréquences qui ne sont plus limitées par l'ouverture numérique de notre objectif ou par la diffraction.

Nous constatons finalement que le phénomène de diffusion multiple fait partie des phénomènes non-linéaires que nous avons abordés dans le chapitre précédent : la « réponse » (E_d) de l'échantillon ne dépend pas linéairement de l'éclairement utilisé (E_{ref}), mais d'une fonction d'illumination « effective » (E_{tot}) qui dépend non linéairement du champ incident. La différence avec les phénomènes non-linéaires présentés dans le chapitre I (STED, SSIM...) qui concernaient la fluorescence, tient au fait que l'objet lui-même modifie la fonction d'illumination effective. Celle-ci ne dépend donc plus seulement de l'éclairement de l'objet, ce qui rend son contrôle plus « difficile » pour un observateur. Une autre manière de voir les choses est de dire que tout se passe comme si l'échantillon était lui-même une sonde de champ proche optique servant à coupler des ondes évanescentes à haute fréquence avec des ondes propagatives détectables en champ lointain.

Pour illustrer l'effet de la diffusion multiple sur le champ diffracté par un objet en champ lointain, nous avons effectué des simulations dont les résultats sont présentés ci-dessous. Nous avons calculé, en utilisant notre modèle direct rigoureux, l'intensité du champ diffracté dans différentes directions par deux pistes larges de 600nm (et hautes de 70nm) éclairées par une onde plane avec une incidence de 50°. Le contraste de permittivité de la première piste est homogène ($\Delta\epsilon = \Delta\epsilon_{moy}$), et celui de la seconde est décrit par la fonction suivante : $\Delta\epsilon = \Delta\epsilon_{moy}(1 + \cos(5k_0x))$. Des simulations ont été effectuées avec ces deux objets pour des contrastes de permittivité moyens croissants ($\Delta\epsilon_{moy}=2, 7$ et 14), et donc une importance croissante du phénomène de diffusion multiple.

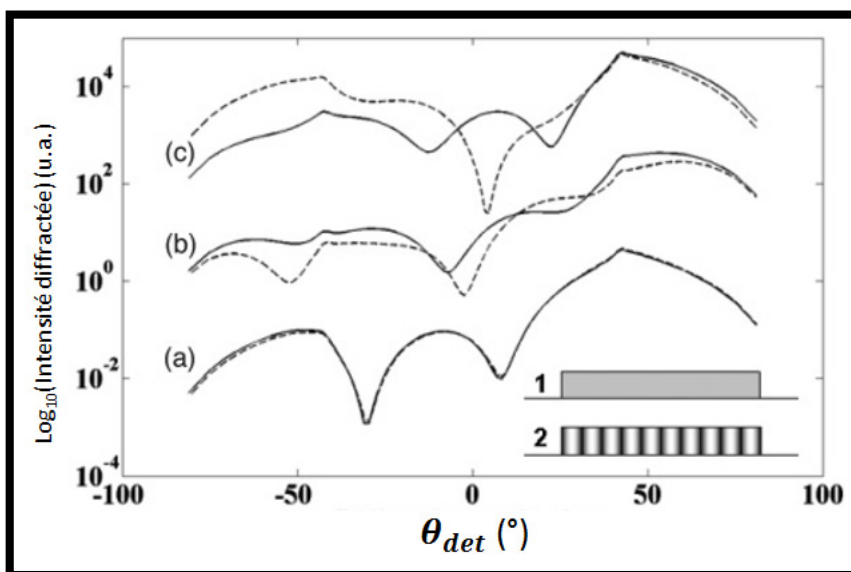


Figure II.1.2-1 : Simulations de l'intensité diffractée en champ lointain par des pistes rectangulaires

Différents contrastes de permittivité moyens sont simulés :

- (a) $\Delta\epsilon_{moy}=2$
- (b) $\Delta\epsilon_{moy}=7$
- (c) $\Delta\epsilon_{moy}=14$

Le contraste dans les pistes est soit homogène (courbes pleines, schéma 1), soit modulé par un cosinus de pulsation $K=5k_0$ (pointillés, schéma 2).

Les résultats montrent que pour des contrastes moyens élevés, une différence claire entre les champs diffractés par l'objet homogène et l'objet modulé est observée, alors qu'elle reste négligeable pour un faible contraste de permittivité. Comme nous l'attendions, il n'y a donc pas d'information utilisable en champ lointain pour distinguer les deux objets dans un régime de diffusion simple. Il y a par contre une influence nette de la modulation haute fréquence de la permittivité sur le champ diffracté, qui va croissante avec le contraste de permittivité lorsque la diffusion multiple est de plus en plus présente.

II.2. Résolution du problème inverse

Nous souhaitons obtenir une image quantitative (la carte de permittivité) de l'objet étudié, à partir de la connaissance d'une partie du champ qu'il diffracte, sous plusieurs angles d'incidence. En pratique, on cherche une estimation de cette carte, à laquelle correspond un champ diffracté le plus proche possible de celui qui est effectivement mesuré. Cette tâche est assez aisée dans le cadre de l'approximation de Born, qui linéarise le problème, et permet de le résoudre par une simple transformée de Fourier inverse après « assemblage » des données obtenues pour diverses incidences (cf. section I.2.2). En dehors de ce cadre, le problème inverse est plus difficile à résoudre. Il est connu pour être mal posé, et en particulier sa solution n'est pas nécessairement unique [112]. Pour pallier à ce problème, nous pouvons introduire des informations *a priori* sur la fonction reconstruite pour réduire l'ensemble des solutions possibles et converger plus rapidement vers une estimation satisfaisante. Par exemple, on peut considérer que le contraste de permittivité est nécessairement positif, ou encore que celui-ci est homogène par parties [113,114]. Pour pouvoir reconstituer des objets fortement diffractants et profiter du potentiel gain en résolution qu'apporte la diffusion multiple, nous avons utilisé un algorithme basé sur une modélisation rigoureuse de l'interaction onde-objet satisfaisant les équations de Maxwell (en dehors de la discrétisation, nécessaire à un traitement numérique)[115-119].

II.2.1. Principe de l'algorithme

Reprenons les équations (II.1-j) et (II.1-u), qui lient le champ diffracté en champ lointain $E_d^{(2)}$ au contraste de permittivité χ et au champ de référence E_{ref} :

$$E_{tot,l} = E_{ref,l} + \mathbf{G}\chi E_{tot,l} \quad (\text{II.2-a})$$

$$\text{et} \quad E_{d,l}^{(2)} = \mathbf{K}\chi E_{tot,l}. \quad (\text{II.2-b})$$

$E_{d,l}^{(2)}$ correspond aux données mesurées expérimentalement, et n'est pas un paramètre inconnu à reconstruire. Nous le noterons M_l par la suite pour le rappeler. La deuxième équation montre clairement que le champ diffracté dépend à la fois du contraste de permittivité et du champ total dans l'objet. Sans l'approximation de Born, le calcul de ce dernier dépend également de la permittivité. Pour résoudre le problème, nous choisissons de trouver les deux paramètres à la fois, en construisant deux séries d'estimations :

$$E_{tot,l,n} = E_{tot,l,n-1} + \alpha_{l,n,v} v_{l,n} + \alpha_{l,n,w} w_{l,n}, \quad (\text{II.2-c})$$

$$\chi_n = \chi_{n-1} + \beta_n d_n. \quad (\text{II.2-d})$$

D'une itération à l'autre, des termes correctifs ($\alpha_{l,n,v} v_{l,n}$, $\alpha_{l,n,w} w_{l,n}$ et $\beta_n d_n$) sont ajoutés à l'estimation précédente, dans le but de faire converger les séries vers un couple $(E_{tot,l,final}, \chi_{final})$ qui correspond le mieux possible aux données expérimentales et au modèle direct rigoureux qui couple entre eux les deux paramètres. Nous quantifions la distance entre données expérimentales, modèle rigoureux et estimations des paramètres, par une fonction coût normalisée, basée sur la norme euclidienne (L^2) :

$$\mathcal{F}_n = \frac{\sum_{l=1}^L \|h_{l,n}^{(1)}\|^2}{W_{E_{ref}}} + \frac{\sum_{l=1}^L \|h_{l,n}^{(2)}\|^2}{W_M}. \quad (\text{II.2-e})$$

Dans cette expression, $h_{l,n}^{(1)}$ et $h_{l,n}^{(2)}$ correspondent à la norme d'erreurs résiduelles, calculées à partir des équations (II.2-a) et (II.2-b) :

$$h_{l,n}^{(1)} = E_{tot,l,n} - (E_{ref,l} + \mathbf{G}\chi_n E_{tot,l,n}) \quad (\text{II.2-f})$$

$$\text{et} \quad h_{l,n}^{(2)} = M_l - \mathbf{K}\chi_n E_{tot,l,n}. \quad (\text{II.2-g})$$

$h_{l,n}^{(1)}$ rend compte de la cohérence des estimations de χ_n et $E_{tot,l,n}$ avec le modèle direct rigoureux, et $h_{l,n}^{(2)}$ fait état de la conformité de ces deux estimations avec les données expérimentales. Les dénominateurs sont de simples coefficients de normalisation qui servent à équilibrer le poids des deux erreurs :

$$W_{E_{ref}} = \sum_{l=1}^L \|E_{ref,l}\|^2 \quad (\text{II.2-h})$$

$$\text{et} \quad W_M = \sum_{l=1}^L \|M_l\|^2. \quad (\text{II.2-i})$$

Pour faciliter la convergence de l'algorithme vers une solution conforme à la réalité, il est utile d'introduire des informations a priori sur les fonctions que nous cherchons à estimer. Nous avons choisi de considérer nos échantillons comme des diélectriques non magnétiques et sans pertes, de permittivité relative supérieure ou égale à celle du milieu de référence. En conséquence, $\Delta\varepsilon$ et χ sont nécessairement positifs ou nuls. Pour intégrer cette connaissance *a priori* aux calculs de l'algorithme, nous posons

$$\chi = \xi^2, \quad (\text{II.2-j})$$

et choisissons d'estimer le paramètre réel ξ plutôt que χ directement. L'équation (II.2-d) est donc remplacée par la suivante :

$$\xi_n = \xi_{n-1} + \beta_n d_n. \quad (\text{II.2-k})$$

II.2.2. Calcul des termes correctifs

Nous devons maintenant définir l'expression des termes correctifs qui permettent de faire converger l'algorithme vers une solution satisfaisante, c'est-à-dire un minimum de la fonction coût. Pour cela, nous utilisons une méthode hybride [120], combinant deux méthodes relativement répandues, utilisant toutes deux un calcul de gradient conjugué conjugué de Polak-Ribière [121] (adapté aux fonctionnelles). La première méthode est appelée « méthode de Born distordue ». Selon celle-ci, la n -ième estimation de ξ est calculée en considérant que le champ total dans l'objet est celui qui existerait si cet objet était correctement décrit par ξ_{n-1} . L'estimation de la permittivité et du champ total se font donc alternativement, en fixant un paramètre pour faire évoluer l'autre. La seconde méthode, dite « méthode du gradient modifié » [114,122], fait évoluer simultanément les deux paramètres ξ_n et E_n^l par des calculs de gradients.

Pour les deux méthodes, les termes correctifs de la permittivité ont la même expression. d_n définit une direction de descente, c'est-à-dire la plus grande pente locale de la fonction coût. Elle est calculée à partir du gradient $g_{n,\xi_{n-1}}$ de la fonction coût par rapport à ξ_{n-1} (ou χ_{n-1}), en supposant que le champ total ne varie pas :

$$d_n = g_{n,\xi} + \gamma_{n,\xi} d_{n-1} \quad (\text{II.2-l})$$

avec
$$\gamma_{n,\xi} = \frac{\langle g_{n,\xi} | g_{n-1,\xi} \rangle}{\| g_{n-1,\xi} \|^2} \quad (\text{II.2-m})$$

et
$$g_{n,\xi} = 2\xi_{n-1} \mathcal{R}e \left[\frac{\sum_{l=1}^L (\bar{E}_{tot,l,n-1} \mathbf{G}^\dagger h_{l,n}^{(1)})}{W_{E_{ref}}} - \frac{\sum_{l=1}^L (\bar{E}_{tot,l,n-1} \mathbf{K}^\dagger h_{l,n}^{(2)})}{W_M} \right] \quad (\text{II.2-n})$$

\bar{X} désigne le complexe conjugué de X , \mathbf{G}^\dagger et \mathbf{K}^\dagger désignent les opérateurs adjoints de \mathbf{G} et \mathbf{K} et enfin, $\langle . | . \rangle$ désigne le produit scalaire de deux fonctions.

Le deuxième élément du terme correctif (β_n) est un paramètre scalaire de pondération. Il permet d'optimiser la « longueur » du déplacement dans la direction de descente, accélérant ainsi la convergence de l'algorithme. Il est lui-même optimisé une fois les directions de descente déterminées, à l'aide d'un gradient conjugué « simple », appliqué à la fonction coût, qui est une fonction scalaire ($\mathcal{F}_n(\alpha_n, \beta_n)$).

Avec la méthode du gradient modifié, la correction itérative de l'estimation de E^l est calculée de la même manière que pour ξ . On calcule d'abord une direction de descente $v_{l,n}$:

$$v_{l,n} = g_{n,E_{tot,l}} + \gamma_{n,E_{tot,l,n}} \times v_{l,n-1} \quad (\text{II.2-o})$$

avec
$$\gamma_{n,E_{tot,l}} = \frac{\langle g_{n,E_{tot,l}} | g_{n-1,E_{tot,l}} \rangle}{\| g_{n-1,E_{tot,l}} \|^2} \quad (\text{II.2-p})$$

et
$$g_{n,E_{tot,l}} = 2\xi_{n-1} \mathcal{R}e \left[\frac{\sum_{l=1}^L (\bar{\chi}_{n-1} \mathbf{G}^\dagger h_{l,n}^{(1)} - h_{l,n}^{(1)})}{W_{E_{ref}}} - \frac{\sum_{l=1}^L (\bar{\chi}_{n-1} \mathbf{K}^\dagger h_{l,n}^{(2)})}{W_M} \right] \quad (\text{II.2-q})$$

La direction de descente ainsi calculée est pondérée par le scalaire $\alpha_{l,n,v}$ équivalent à β_n pour la permittivité.

La méthode de Born distordue met à jour l'estimation du champ total de manière beaucoup plus simple : en calculant, avec le modèle direct rigoureux, le champ total $\tilde{E}_{tot,l,n-1}$ qui serait présent dans l'objet si celui-ci était correctement décrit par l'estimation $n-1$ de χ :

$$\tilde{E}_{tot,l,n-1} = [1 - \mathbf{G}\chi_{n-1}]^{-1}. \quad (\text{II.2-r})$$

On a donc un terme correctif du champ égal à :

$$w_{l,n} = \tilde{E}_{tot,l,n-1} - E_{tot,l,n} \quad (\text{II.2-s})$$

d'où
$$E_{tot,l,n} = E_{tot,l,n-1} + w_{l,n} = \tilde{E}_{n-1}^l. \quad (\text{II.2-t})$$

Un paramètre de pondération $\alpha_{l,n,w}$ peut-être ajouté devant la correction $w_{l,n}$, pour forcer la diminution de la fonction coût. On parle alors de méthode de Born modifiée.

La méthode hybride que nous avons utilisée s'inspire de la méthode de Born modifiée et de celle du gradient modifié. Elle utilise à la fois les deux termes de correction de l'estimation du champ total, simplement en les sommant comme nous l'avons écrit dans l'équation (II.2-c). Cela permet à l'algorithme de converger plus rapidement que les deux méthodes séparément [120]. Les scalaires de pondération β_n , $\alpha_{l,n,v}$ et $\alpha_{l,n,w}$ sont calculés conjointement par un gradient conjugué de la fonction coût, forçant la convergence de l'algorithme.

II.2.3. Estimations de départ

L'obtention des estimations initiales du champ total et de la permittivité se fait à l'aide d'une rétro-propagation du champ diffracté [116]. Celle-ci s'effectue en multipliant le champ lointain mesuré par l'adjoint de l'opérateur de propagation \mathbf{K} . On obtient ainsi une estimation de la distribution des sources de champ électrique, c'est-à-dire du produit $E_{tot,l} \times \Delta\epsilon$ (cf. (II.1-u)), pour chacun des L éclairissements incidents :

$$S_{l,0} = \chi_0 E_{tot,l,0} = \gamma \mathbf{K}^\dagger M_l \quad (\text{II.2-u})$$

Le terme γ est un paramètre scalaire calculé (par un gradient conjugué ou par une minimisation de type simplex) pour minimiser la fonction coût G , qui prend en compte simultanément l'ensemble des mesures :

$$G(\gamma) = \sum_{l=1}^L \|M_l - \mathbf{K} S_{l,0}\|^2 = \sum_{l=1}^L \|M_l - \gamma \mathbf{K} \mathbf{K}^\dagger M_l\|^2 \quad (\text{II.2-v})$$

Cette fonction coût montre l'écart entre le champ lointain mesuré et le champ lointain correspondant aux estimations initiales de χ et $E_{tot,l}$. Pour dissocier les contributions de χ_0 et $E_{tot,l,0}$ dans le terme $S_{l,0}$ ainsi obtenu, on utilise l'équation (II.2-a) pour calculer $E_{tot,l,0}$:

$$E_{tot,l,0} = M_l + \mathbf{G} S_{l,0} \quad (\text{II.2-w})$$

II.3. Dispositif expérimental

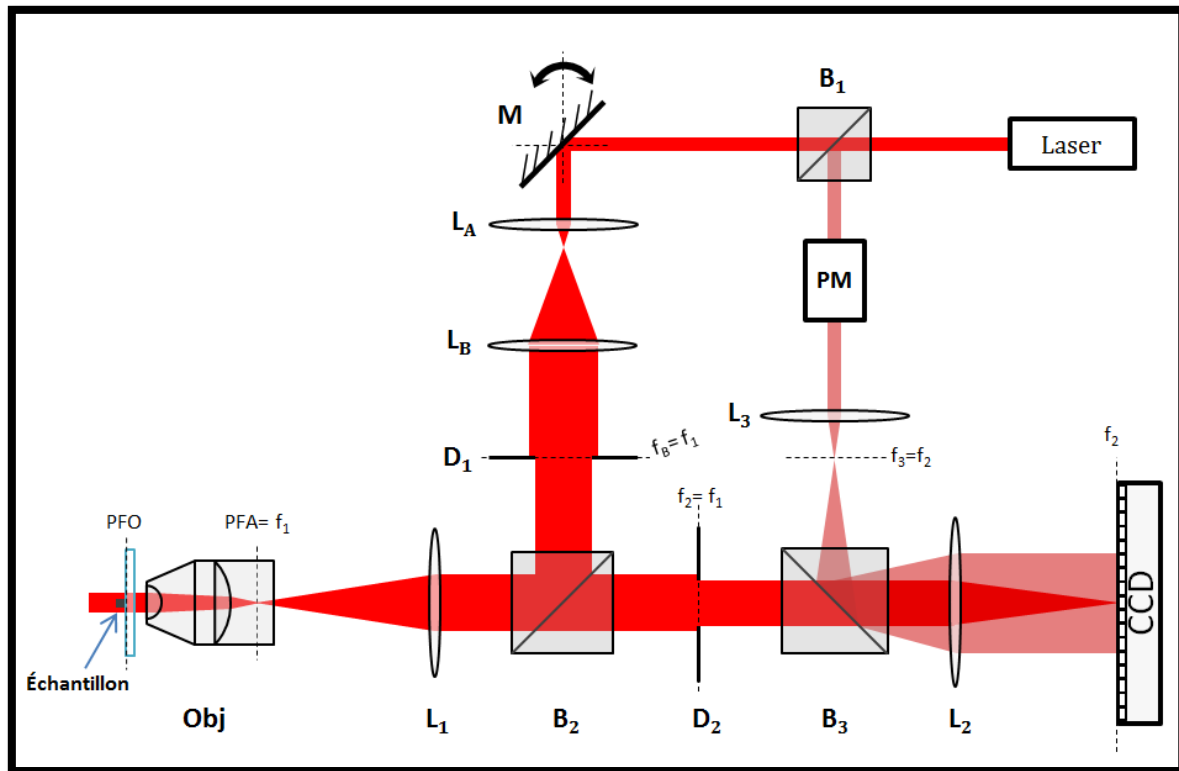


Figure II.2.3-a : Montage expérimental pour la tomographie optique de diffraction

Le microscope que nous avons utilisé pour faire de la tomographie optique de diffraction a été réalisé à l'horizontale sur une table optique, sans statif conventionnel de microscopie. Il est fortement inspiré du montage proposé par Lauer en 2002 [107]. Rappelons que ce montage doit répondre principalement à deux objectifs : il doit permettre d'éclairer un échantillon diffractant avec une quasi-onde plane monochromatique sous plusieurs angles successifs et contrôlés, et il doit permettre d'enregistrer l'amplitude et la phase du champ électrique diffracté par l'échantillon en champ lointain.

II.3.1. Montage optique

L'éclairement à 633nm est assuré par un laser Hélium-Néon de puissance 10mW polarisé linéairement. Le faisceau est réfléchi par un miroir (M) posé sur une monture à deux axes de rotation. Ces deux axes se coupent au centre du miroir, ce qui évite tout déplacement de celui-ci. Son orientation est contrôlée par deux moteurs pas à pas, pilotés via un programme

LabView. Après ce miroir, une succession de lentilles permet d'élargir le faisceau et d'obtenir, en sortie de l'objectif de microscope (Obj), un faisceau collimaté. Les larges angles d'incidence accessibles avec l'ouverture numérique de l'objectif (jusqu'à environ $\pm 58^\circ$ pour l'objectif à huile d'ouverture numérique 1.3) sont couverts avec des déviations de quelques degrés du faisceau par le miroir, grâce au grandissement important entre celui-ci et l'échantillon. Le centre du plan focal objet et l'intersection des axes de rotation du miroir sont conjugués, de manière à ce que la zone éclairée par le faisceau soit toujours la même, quel que soit l'angle d'éclairement. Un diaphragme (D1) situé dans un plan conjugué à l'intersection des axes de rotation du miroir permet de vérifier l'alignement du montage et de couper les bords du faisceau gaussien pour garder sa partie centrale où l'intensité est quasiment homogène.

Les valeurs complexes du champ électrique diffracté sont obtenues par holographie numérique, grâce à la méthode du décalage de phase. Pour cela, une partie du faisceau est prélevée par un cube séparateur placé avant le miroir (B1) et servira de faisceau de référence. Un modulateur de phase électro optique (New Focus, modèle 4002-M) est placé sur le chemin de ce faisceau (PM). Composé de cristaux (LiTaO_3 et LiNbO_3) dont l'indice optique change rapidement en fonction du champ électrique qui lui est appliqué¹, il permet d'introduire un déphasage supplémentaire contrôlable du faisceau de référence par rapport au faisceau éclairant l'objet.

Le champ diffracté vers l'arrière par l'objet est collecté par l'objectif, séparé du faisceau incident par un premier cube séparateur (B_2), puis recombinaison avec le faisceau de référence par un second cube (B_3). Après l'objectif, la première lentille (L_2) permet de former une image intermédiaire dans le plan où un second diaphragme (D_2) est placé; il permet de réduire le champ de vue sans modifier la largeur du faisceau incident et facilite également l'alignement du montage. Une seconde lentille (L_2) sépare ce premier plan image du plan où est placée la caméra CCD. Le faisceau de référence est élargi et collimaté par cette même lentille (L_2), combinée à une autre lentille placée entre le modulateur de phase et le cube séparateur. Par conséquent, la mesure se fait dans l'espace réciproque, c'est-à-dire dans un plan équivalent au plan (2) de la Figure I.1-3 (p15). Notre algorithme d'inversion utilise les valeurs du champ diffracté en champ lointain ; le choix d'une mesure dans ce plan de Fourier

¹ Ce changement d'indice est dû à l'effet Pockels, observable dans les cristaux ne présentant pas de symétrie centrale.

était donc naturel [107,123]. Le passage du plan image (espace direct) au plan de Fourier (espace réciproque) peut toutefois se faire facilement, par une simple transformée de Fourier des données numériques, et une détection dans le plan image reste possible¹.

II.3.2. Mesures

Avant toute mesure, une lentille supplémentaire est ajoutée à la place de la caméra : elle permet d'obtenir une nouvelle image de l'échantillon dans son plan focal image, et d'y focaliser le faisceau de référence. En plaçant la caméra dans ce plan, il est possible de régler la position de l'échantillon en z : celui-ci doit apparaître net lorsqu'il est dans le plan focal objet (PFO). Nous réglons également la position (virtuelle au niveau de l'objet) du point de focalisation du faisceau de référence. Ce point constituera l'origine des phases lors de l'inversion de données. Il doit donc être correctement placé au centre du domaine Ω que l'on souhaite imager. En pratique, on règle la référence pour qu'elle focalise à peu près au milieu de l'image, puis on déplace l'échantillon sur le point de focalisation. L'échantillon est déposé sur un substrat plan en silicium ou en verre selon les cas. Il est maintenu à la verticale par un porte-échantillon et sa position est finement réglée dans les trois directions à l'aide de vis de translations micrométriques. Il est également nécessaire de l'orienter correctement dans le plan (xy) afin que son axe d'invariance soit perpendiculaire au plan de la table optique qui est celui balayé par les différentes directions d'illumination lors de la mesure.

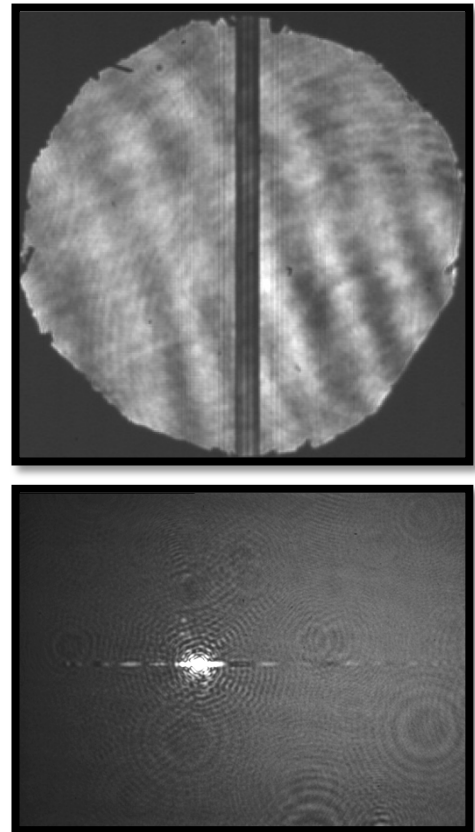


Figure II.3.2-a : Image de pistes obtenue dans le plan image (haut) et le plan de Fourier (bas)

¹ Cette option a par ailleurs été préférée pour les travaux qui ont suivis ceux présentés dans cette thèse.

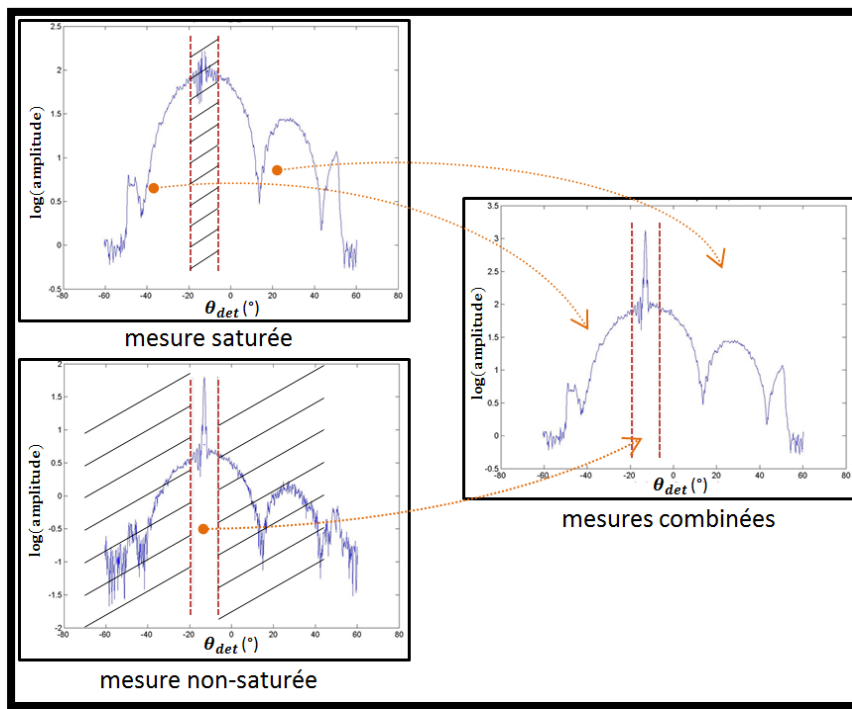


Figure II.3.2-b : Combinaison des mesures saturées et non-saturées

Une fois ces réglages effectués, la lentille est enlevée et la caméra remplacée dans le plan focal image de (L2). L'objet, invariant dans une direction, diffracte principalement sur une ligne horizontale du capteur CCD. Les mesures sont entièrement pilotées par LabView. Pour chaque angle d'incidence, la phase du faisceau de référence est modulée par le modulateur

électro-optique (PM), et plusieurs cycles de 4 mesures (déphasages de 0 , $\pi/2$, π et $3\pi/2$) sont effectués, pour finalement obtenir un seul résultat moyen. Pour chacun des cycles, la combinaison des mesures de l'intensité formées par l'interférence du champ diffracté et du faisceau de référence avec ces 4 déphasages permet de retrouver la phase et l'amplitude du champ électrique diffracté en tout point de la caméra [124,125]. L'angle d'incidence est ensuite changé par les moteurs contrôlant l'orientation du miroir (M) et de nouvelles mesures sont effectuées. Au total, une douzaine d'incidences sont utilisées, réparties parmi celles qui sont accessibles avec l'ouverture numérique de l'objectif utilisé.

Les mesures s'effectuent généralement en deux temps. La réflexion spéculaire du faisceau (*i.e.* la partie non diffractée par l'échantillon) étant très intense, il est nécessaire d'atténuer fortement le faisceau incident en premier lieu. Cette réflexion spéculaire doit en effet être correctement mesurée pour pouvoir normaliser les données par la suite (*cf.* section 0). Une première série de mesures est donc réalisée en plaçant une densité optique devant le laser, suffisamment importante pour ne jamais saturer le capteur de la caméra. Elle est suivie d'une seconde série de mesures, effectuée avec une densité optique moindre, afin d'augmenter le rapport signal à bruit en dehors de la zone saturée par la réflexion spéculaire. Les données seront ensuite fusionnées pour obtenir l'ensemble final qui sera inversé.

II.3.3. Fabrication de l'échantillon

Les échantillons observés ont été fabriqués au Laboratoire de Photonique des Nanostructures, à Marcoussis par Anne Talneau. Deux types d'échantillons ont été utilisés : des pistes de résine déposée sur un substrat de silicium monocristallin, et des pistes de germanium déposées sur une fine lamelle de verre destinée à la microscopie optique. Puisque nous voulons tester la résolution et la fiabilité de nos reconstructions, nous souhaitons que nos échantillons soient de petites dimensions (jusqu'à environ 100nm centre à centre), et que ces dimensions soient bien contrôlées. Pour ces deux raisons, ils ont été fabriqués par lithographie électronique, et ont subis de nombreux contrôles et étapes de calibration par microscopie électronique à balayage, puis AFM.

Les pistes de résines sont formées directement par lithographie électronique d'une résine négative (ma-N 2403, Micro Resist Technology). Les zones insolées par le faisceau sont les seules qui résistent au développement, ce qui permet une fabrication relativement rapide une fois les calibrations de dose effectuées.

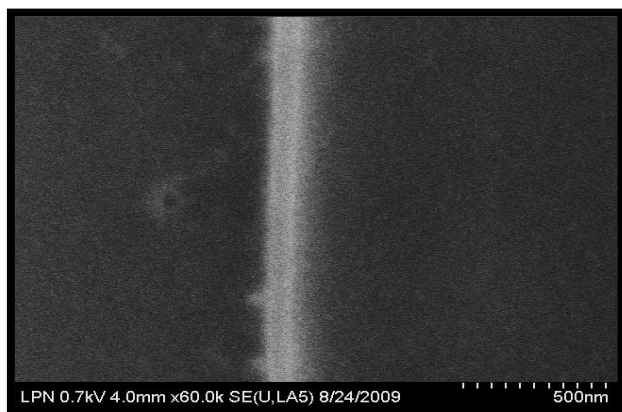


Figure II.3.3-1 : Observation au MEB des pistes de germanium de 50nm de large séparées de 100nm centre à centre.

Les pistes de germanium ont été fabriquées par un procédé de type « lift-off ». Des lamelles de verre standard pour la microscopie d'environ 170µm d'épaisseur servent de substrat. Après un nettoyage, une fine couche de SiO₂ est déposée sur une des faces pour favoriser l'accroche du germanium. Une résine positive de type PMMA est déposée puis insolée par un faisceau d'électron

focalisé (e-beam). Pour permettre l'évacuation des électrons lors de cette insolation et en raison du caractère isolant du substrat de verre, 50 nanomètres d'aluminium auront été préalablement déposés sur la résine et seront retirés ensuite par un bain de soude. Après retrait de l'aluminium avec de la soude puis développement de la résine, on obtient des sillons dans le PMMA où se situeront les pistes de germanium. Un dépôt de 30nm de germanium est effectué sur toute la surface de l'échantillon et la résine non-insolée est

finalement dissoute, ce qui permet la séparation du germanium déposée sur celle-ci, laissant celui qui s'est déposé dans les sillons.

II.4. Traitement des données expérimentales

Notre objectif est d'obtenir une carte de la permittivité de l'objet observé. Cela nécessite évidemment une connaissance quantitative précise du champ incident et du champ diffracté mesuré. Nous présentons ici les procédures de calibration et de normalisation qui nous assurent cette connaissance à partir des données brutes de l'expérience.

II.4.1. Calibration angulaire

Nous avons vu que le champ diffracté par l'échantillon est enregistré dans le plan de Fourier sur le capteur pixellisé d'une caméra CCD. Le plan de Fourier nous donne accès aux différents angles de détection en champ lointain : chaque point de ce plan correspond à une onde plane se propageant selon une direction particulière de l'espace direct (cf. p17). La correspondance entre chaque pixel de détection et une direction qui lui est propre doit être déterminée avec précision. Elle permettra de connaître non seulement les angles de détection, mais également l'angle d'illumination à partir de la réflexion spéculaire du faisceau incident. Un simple modèle d'optique géométrique ne permet pas de rendre compte de l'utilisation d'un objectif de grande ouverture numérique, et nous voulons également prendre en compte d'éventuelles erreurs d'orientation et d'alignement des optiques et de la caméra CCD.

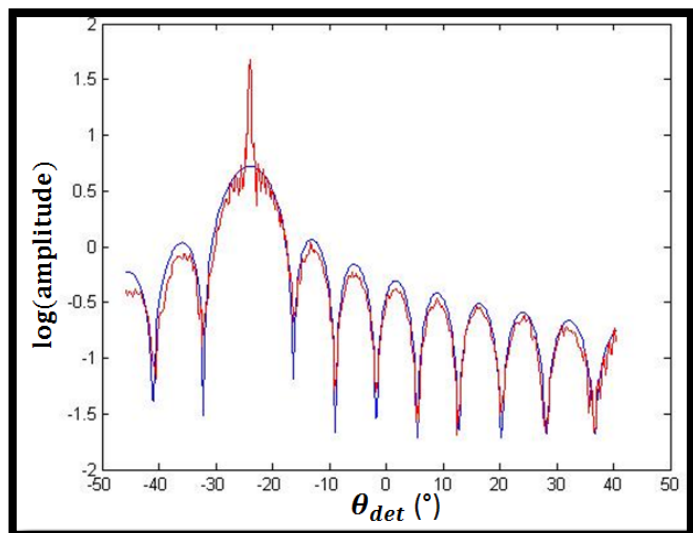


Figure II.4.1-1 : Accord entre l'amplitude mesurée (rouge) et simulée (bleu) du champ diffracté après calibration de la correspondance pixel-angle de

Pour cela, nous utilisons un échantillon de référence dont la géométrie et la permittivité sont connues. Nous modélisons le champ qu'il diffracte avec le modèle direct introduit dans la section II.1.1, et faisons correspondre angulairement les données expérimentales aux résultats obtenus par cette modélisation. Pour attribuer une valeur angulaire aux autres pixels, on utilise les positions théoriques des minima d'amplitude du champ diffracté par l'échantillon de référence, données par la simulation. Ces minima sont facilement reconnaissables dans les mesures, indépendamment des éventuelles aberrations sur la phase ou des fluctuations d'intensité qui seront corrigés par la suite. Une fois repérés (manuellement sur les données), il n'y a aucune difficulté à retrouver la valeur angulaire des 768¹ pixels utilisés, qui suit généralement une loi du type :

$$x = C \times \sin(\theta), \quad (\text{II.4-a})$$

ce qui est en accord avec la condition des sinus d'Abbe (*cf.* section I.1.2).

II.4.2. Origine des phases

La normalisation de la phase des données mesurées nécessite au préalable le positionnement d'une origine des phases, c'est-à-dire du point de référence où la phase est considérée comme nulle dans le plan de l'échantillon. Normalement, ce point correspond au point de focalisation virtuel du faisceau de référence avec lequel on fait interférer le champ diffracté. Ce point constitue l'origine du repère de la reconstruction effectuée par l'algorithme, et on souhaite qu'il soit situé à la surface du substrat et centré sur l'échantillon étudié. En pratique cependant, il est impossible de le positionner parfaitement. Nous devons donc corriger un probable décalage, entre les positions théoriques et expérimentales avant l'inversion des données. Si $E_{diff}^{\vec{d}}(\vec{k}_{det}, \vec{k}_{inc})$ est le champ diffracté dans la direction \vec{k}_{det} par un objet éclairé par une onde plane de vecteur d'onde \vec{k}_{inc} , lorsque que l'origine des phases est décalées de \vec{d} par rapport à sa position théorique, on a la relation :

$$E_{diff}^{\vec{d}}(\vec{k}, \vec{k}_{inc}) = E_{diff}^{\vec{0}}(\vec{k}, \vec{k}_{inc}) e^{i(\vec{k}_{det} - \vec{k}_{inc}) \cdot \vec{d}} \quad (\text{II.4-b})$$

¹ 768 pixels d'intérêt est une valeur typique, qui peut varier d'une mesure à l'autre en fonction des réglages du montage et du grossissement de l'objectif utilisé.

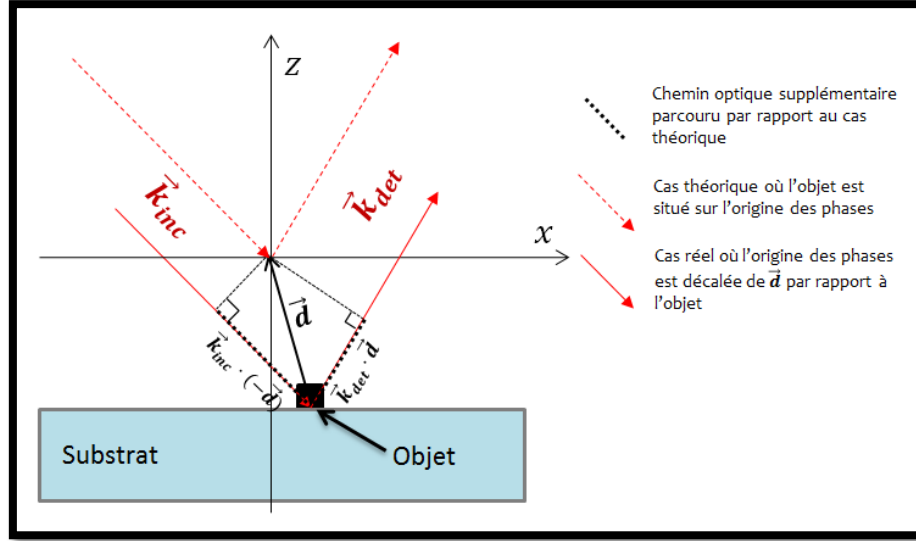


Figure II.4.2-1 : Influence d'un décalage de l'origine des phases \vec{d} sur la phase d'une onde diffractée par l'objet

Un terme de phase, qui dépend de , de la direction de détection (associée à) et de la direction d'éclairement (associée à) est donc présent dans le champ mesuré,

$$\Delta\phi(\vec{d}) = (\vec{k}_{det} - \vec{k}_{inc}) \cdot \vec{d}, \quad (\text{II.4-c})$$

et doit être corrigé. Si ce n'est pas fait, le domaine Ω à l'intérieur duquel l'inversion est effectuée ne sera pas centré sur l'objet. Une partie de cet objet peut donc se situer en dehors du domaine reconstruit. Cette potentielle erreur s'avère utile pour retrouver les composantes du vecteur \vec{d} : (d_x, d_z) . Pour cela, nous minimisons une fonction coût comparant le champ mesuré au résultat de sa rétropropagation vers Ω , puis « re »propagation en champ lointain :

$$G(d_x, d_z, \gamma) = \sum_{l=1}^L \left\| \widetilde{M}_l(d_x, d_z) - \gamma \mathbf{K} \mathbf{K}^\dagger \widetilde{M}_l(d_x, d_z) \right\|^2 \quad (\text{II.4-d})$$

$\widetilde{M}_l(d_x, d_z)$ correspond aux mesures corrigées en phase en soustrayant le terme $\Delta\phi(\vec{d})$ calculé pour chaque angle de détection et chaque angle d'incidence. Si l'origine des phases est mauvaise et qu'une partie de l'objet se situe en dehors de Ω , celle-ci sera « perdue » lors de la rétropropagation et un écart important entre les deux termes de la fonction coût augmentera sa valeur. À l'inverse, la valeur de \vec{d} minimisant la fonction G donne une bonne estimation du décalage réel. La minimisation est effectuée à l'aide d'un algorithme de type simplex [121]. Une fois \vec{d} trouvé, les mesures sont définitivement corrigées pour procéder aux étapes de normalisation puis à l'inversion.

II.4.3. Normalisation en phase et amplitude

L'algorithme d'inversion est prévu pour que les données utilisées en « entrée » correspondent aux $\widetilde{E}_d^{(1)}(\alpha)$ (multipliés par $\Gamma(\alpha)$) de l'équation (II.1-o) (ou (II.1-s) selon le cas), obtenus avec une onde plane d'amplitude unitaire. Après correction du décalage de l'origine des phases, les valeurs brutes mesurées sont effectivement proportionnelles à cette grandeur, mais un coefficient complexe de proportionnalité inconnu subsiste. Il regroupe plusieurs éléments :

- une probable erreur (constante pour chaque mesure) sur la phase du champ, pouvant être causée par exemple par des modifications du chemin optique par dérive thermique
- l'amplitude de l'onde incidente, qui peut fluctuer d'une mesure à l'autre à cause des instabilités du laser.
- l'intégration du signal sur la surface d'un pixel, qui correspond à un petit intervalle angulaire de collection $\delta\alpha$
- la relation mal connue entre la valeur obtenue pour un pixel de la caméra et l'intensité du champ électrique (ou le nombre de photons) effectivement émis en champ lointain dans la direction α correspondante

Pour s'affranchir de ce coefficient de proportionnalité et obtenir un résultat quantitatif, la réflexion spéculaire sert de référence pour normaliser les données. Celle-ci correspond au champ réfléchi par le substrat lorsqu'il est éclairé par une onde plane de même amplitude inconnue que l'échantillon, sous un angle d'incidence connu. Nous supposons que la contribution du champ diffracté au signal mesuré dans la direction de la réflexion spéculaire est négligeable par rapport à celle-ci. Cette hypothèse est évidemment vérifiée sous l'approximation de Born du premier ordre, mais elle l'est également en régime de diffusion multiple, lorsque l'échantillon est petit devant le champ de vue total (c'est effectivement le cas pour toutes nos mesures). La présence du diaphragme D2 limite la surface sur laquelle l'onde incidente est effectivement réfléchie. En gardant une analyse 2D, cette surface correspond à une fente centrée en $x=0$ et dont la largeur est donnée par le diamètre du diaphragme, après correction par le grandissement entre celui-ci et le plan focal objet¹. Le

¹ Ce diamètre est évalué à partir d'une transformée de Fourier inverse du champ mesuré sur l'ensemble du capteur de la caméra. On obtient alors une image du champ dans le plan objet, faisant clairement apparaître les bords du diaphragme. Le grandissement est évalué à partir des distances focales de l'objectif et de la lentille de tube L1.

champ réfléchi peut alors être calculé analytiquement par diffraction de Fraunhofer, ce qui donne le résultat suivant :

$$E_r(x, z = 0) = A_{inc} \int r_{1,2} \frac{a}{\pi} \sin[a(\alpha_{inc} - \alpha)] e^{i\alpha x} d\alpha. \quad (II.4-e)$$

et donc $\widetilde{E}_r^{(1)}(\alpha) = A_{inc} r_{1,2}(\alpha_{inc}) \frac{a}{\pi} \sin[a(\alpha_{inc} - \alpha)]$.

$r_{1,2}$ est le coefficient (complexe) de réflexion de Fresnel, donné par l'équation (II.1-d), A_{inc} est l'amplitude (réelle) de l'onde incidente, α_{inc} est la projection du vecteur d'onde de l'onde incidente sur l'axe des x , et a est le rayon du diaphragme corrigé du grandissement de l'objectif et des lentilles. La normalisation consiste à faire correspondre la valeur complexe du champ mesuré dans la direction α_{inc} avec sa valeur théorique lorsque A_{inc} vaut 1, c'est à dire : $r_{1,2}(\alpha_{inc})(a/\pi)$ en divisant l'ensemble des mesures par une constante complexe adéquate.

II.4.1. Correction des aberrations

Nous pouvons nous attendre à observer des aberrations créées par l'imperfection prévisible des optiques et de leur alignement. Pour corriger la distorsion du front d'onde qui en résulte, et que l'on suppose constante lors de nos mesures, nous utilisons une fois de plus un échantillon de référence. Un profil d'aberrations est obtenu à partir de la différence entre la phase mesurée et la phase théorique. Nous faisons correspondre à cette différence « brute » une fonction polynomiale, qui nous donne un profil lissé des aberrations, qui sera utilisé pour corriger les mesures de phase effectuées par la suite.

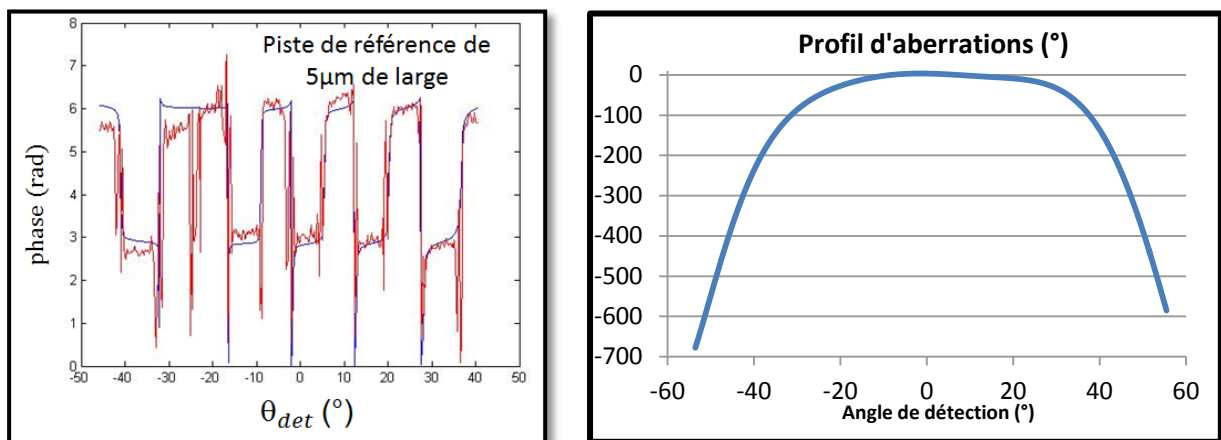


Figure II.4.1-1 : Accord entre la phase mesurée (rouge) et simulée (bleu) du champ diffracté par un échantillon de référence, après correction du profil d'aberration obtenu (à droite)

II.5. Résultats expérimentaux

Nous présentons dans cette section les résultats les plus significatifs que nous avons obtenus au cours de cette thèse [118,119,126]. Ceux-ci ont pour but de montrer la validité de notre approche et de notre méthode d'inversion itérative, et également de montrer que la prise en compte de la diffusion multiple peut apporter un gain de résolution dans certains cas.

II.5.1. Validation de l'inversion non-linéaire et comparaison avec une inversion linéaire

Dans un premier temps, nous avons souhaité comparer les cartes de permittivité obtenues avec notre méthode avec le profil d'intensité mesuré avec un microscope en champ large classique et le profil de réflectivité obtenu avec un algorithme d'inversion linéaire simple, utilisant la synthèse d'ouverture de la tomographie. Ce dernier est couramment utilisé pour l'imagerie de surface par tomographie optique de diffraction. Il consiste à considérer l'échantillon observé comme un échantillon plan, caractérisé par sa réflectivité R . Le champ électrique réfléchi dans le plan focal objet est alors approximé par la relation

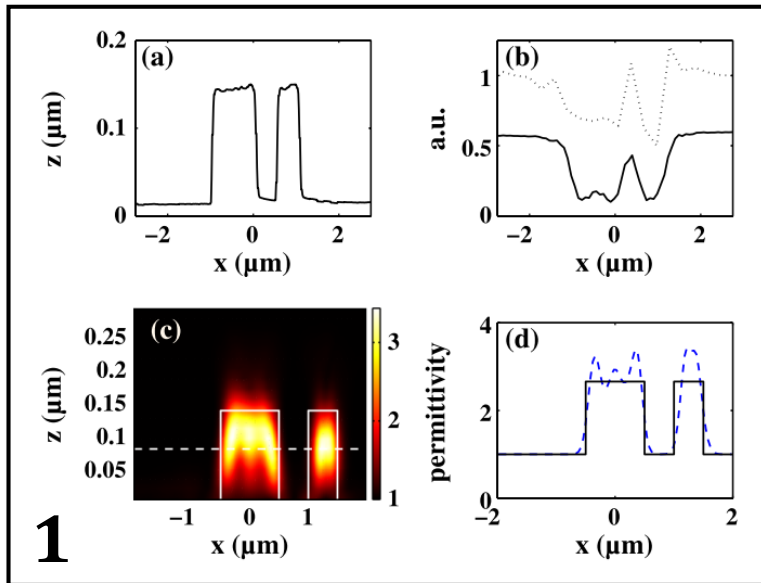
$$E(x, y) = R(x, y)E_{inc}(x, y). \quad (\text{II.5-a})$$

Cette relation est équivalente pour un échantillon plan au résultat obtenu sous l'approximation de Born avec une analyse 3D (*cf.* section I.2.2) : avec ce modèle, l'onde plane collectée en champ lointain dans la direction donnée par α_{det} a une amplitude proportionnelle à $\tilde{R}(\alpha_{det} - \alpha_{inc})$. L'algorithme d'inversion réalise une synthèse d'ouverture en combinant les informations spectrales obtenues avec les différentes incidences d'éclairement, et effectue une transformée de Fourier inverse pour obtenir une « image » super-résolue de R .

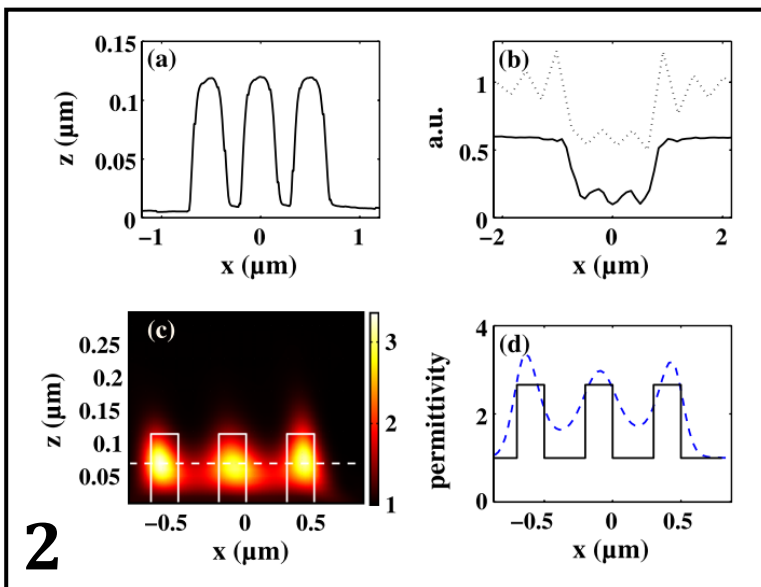
Les échantillons observés sont des pistes de résine déposées sur un substrat de silicium cristallin, dont les dimensions sont de l'ordre de la centaine de nanomètres (*cf.* section II.3.3 concernant leur fabrication). Nous sommes donc dans le cas 1 de la Figure II.1.1-b. La permittivité du substrat de silicium est égale à $15.07+0.148i$, et celle de la résine a été mesurée par ellipsométrie à 2.66. La détection a été réalisée sur 668 pixels de la caméra

CCD, correspondants à 668 angles de détections répartis entre -46° et $+46^\circ$, ce qui correspond à peu près à l'ouverture numérique de l'objectif utilisé (Zeiss 'Fluar' x20, NA 0.75). 10 éclaircissements différents ont été utilisés, pour des angles d'incidence variant de $+32^\circ$ à -32° . La limite de résolution définie par le critère d'Abbe dans ce cas (*cf. p11*) vaut $\lambda/(\sin \theta_{det,max} + \sin \theta_{inc,max}) \approx 500\text{nm}$.

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure II.5.1-1. Nos reconstructions correspondent bien aux profils mesurés par microscopie à force atomique et nous obtenons également une valeur de la permittivité proche de celle du matériau. Les pistes étudiées sur les figures 2 et 3 ont une distance centre à centre égale à la limite d'Abbe, et sont correctement résolues, à l'inverse des résultats obtenus avec une observation en champ large classique ou même avec un algorithme d'inversion linéaire. On ne distingue en effet qu'à peine (échantillon 2) ou pas du tout (échantillon 3) les 3 pistes de résine sur l'image en champ large classique et le profil reconstruit avec l'algorithme d'inversion linéaire. Ce résultat n'est pas surprenant pour l'observation en champ large classique : les dimensions de l'échantillon se situent à la limite du critère d'Abbe, et l'utilisation d'un éclaircissement incohérent atténue les hautes fréquences de l'image. En revanche, il n'y a pas d'atténuation de ces hautes fréquences avec la tomographie optique de diffraction, et on pourrait s'attendre pour cette raison à obtenir un meilleur résultat avec l'algorithme d'inversion classique. Sa mauvaise performance s'explique probablement par une grande sensibilité au bruit des mesures et par le phénomène des oscillations de Gibbs (qui apparaissent à proximité d'une discontinuité lorsque les hautes fréquences d'une fonction sont coupées).



(a) Profil des pistes mesuré à l'AFM.
 (b) Profil de l'image obtenue avec un microscope en champ large classique à ouverture numérique identique (courbe pleine) et profil de la réflectivité obtenu avec l'algorithme d'inversion linéaire appliqué à nos mesures (pointillés).
 (c) Carte de permittivité reconstruite par notre algorithme d'inversion non-linéaire et profil attendu des pistes (courbes pleines).
 (d) Profil de permittivité au niveau de la ligne de pointillés blanche sur l'image (c). Profil reconstruit (pointillés bleus) et théorique (courbe pleine).



Échantillons observés

1. 2 pistes de résine de 140 nm de hauteur, 1 μm et 0.5 μm de largeur, et séparées de 1.25 μm centre à centre.
2. 3 pistes de résine de 110 nm de hauteur, 200 nm de largeur, et séparées de 500 nm centre à centre.
3. 3 pistes de résine de 110 nm de hauteur, 100 nm de largeur, et séparées de 500 nm centre à centre

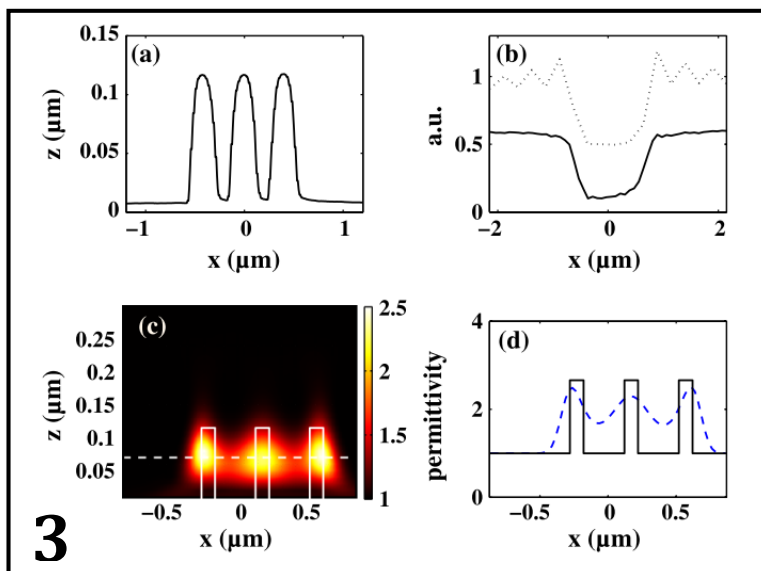


Figure II.5.1-1

Résultats obtenus pour des pistes de résine déposée sur un substrat de silicium

II.5.2. Super-résolution sur des échantillons fortement diffractants

Après les résultats satisfaisants obtenus pour des échantillons en résine, nous avons observé des échantillons de permittivité élevée, afin de mettre en évidence l'influence du phénomène de diffusion multiple[119]. Ces échantillons sont toujours des pistes considérées invariantes en y , composées cette fois de germanium, dont la permittivité à 633nm vaut $29.8+7.3i$. Déposées sur un substrat de verre, elles sont éclairées et observées à travers celui-ci à l'aide d'un objectif à huile de grande ouverture numérique (Nikon, x40, NA 1.3). La configuration correspond donc cette fois au cas 2 de la Figure II.1.1-b.

Nous avons reconstruit à partir de données expérimentales la carte de permittivité de deux pistes de germanium de 50nm de large, 25nm de haut et séparées centre à centre de 100nm (cf. (d), sur la Figure II.5.2-1). Pour vérifier l'influence du phénomène de diffusion multiple, nous avons effectué la même inversion sur des données simulées¹ pour des pistes de mêmes dimensions, mais présentant un très faible contraste de permittivité ($\Delta\epsilon = 0.01$). Comme on peut le constater, la reconstruction fonctionne très bien sur les pistes de germanium, bien que leur distance centre à centre soit près de 2,5 fois inférieure à la limite d'Abbe pour notre ouverture numérique ($633/(2 \times 1.32) = 243\text{nm}$). À l'inverse, en accord avec la limite de résolution attendue sous l'approximation de Born, la reconstruction avec notre algorithme ne permet effectivement pas de distinguer les deux pistes avec un faible contraste de permittivité, même sur des données simulées non-bruitées.

L'effet de la diffusion multiple est mis en valeur par nos simulations du champ électrique formé à l'intérieur de l'objet (cf. (a) et (b) sur la Figure II.5.2-1), lorsque celui-ci est éclairé avec un angle d'incidence de 50° . En effet, ce champ est homogène pour les pistes à faible contraste, égal au champ formé en l'absence d'objet. Pour les pistes de germanium en revanche, une structuration forte du champ apparaît, et on observe clairement que celui-ci contient des fréquences élevées, qui permettent de « sonder » les détails de la structure des pistes.

¹ à l'aide de notre modèle direct rigoureux

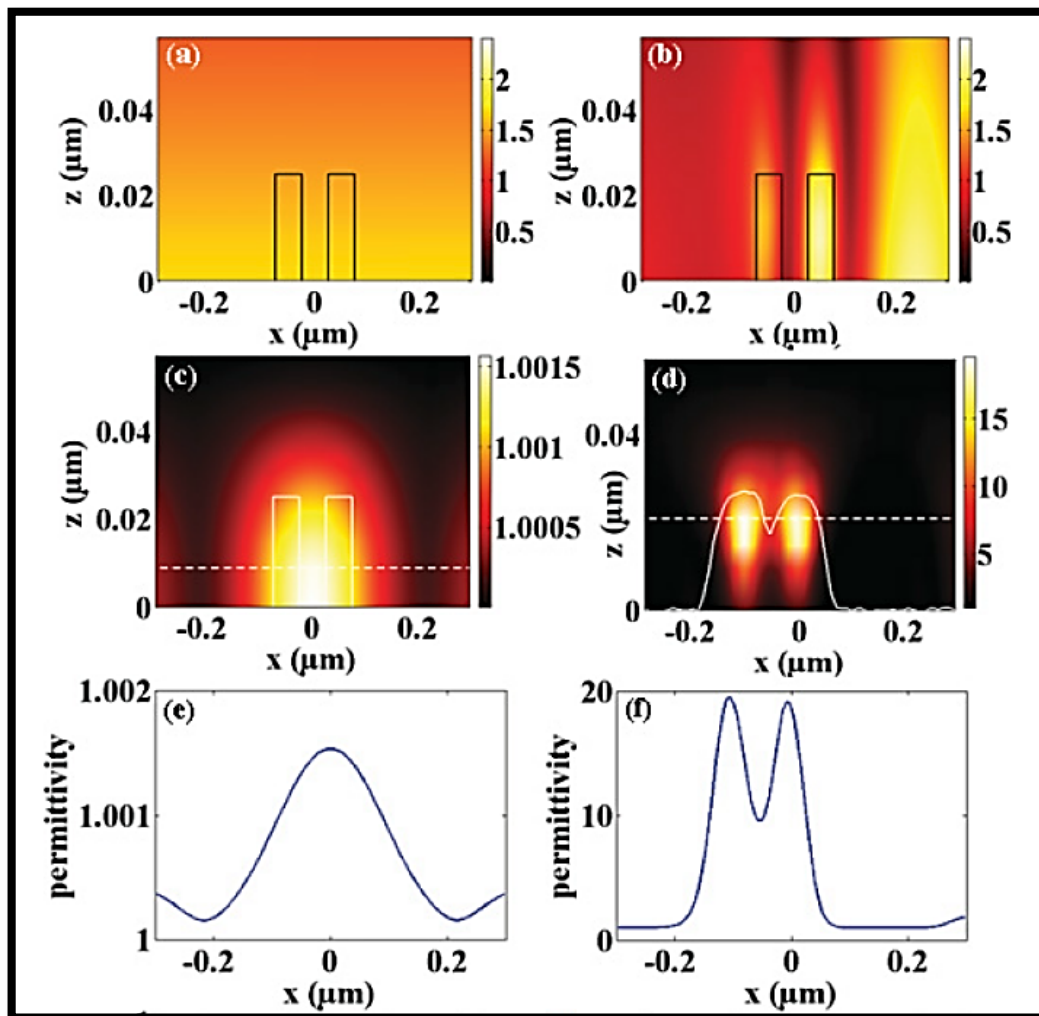


Figure II.5.2-1 : Reconstruction de deux pistes de dimensions sous la limite de résolution d'Abbe, en régime de diffusion simple et multiple

(a) et (b) : simulation du champ total formé avec un éclairage d'incidence 50°

(c) et (d) : cartes de permittivité (partie réelle), reconstruites avec notre algorithme d'inversion non-linéaire

(e) et (f) : profils de permittivité le long des lignes en pointillés tracées en (c) et (d), respectivement

gauche : Pistes de 25nm de hauteur, 50nm de large et 100nm de distance centre à centre, $\epsilon_r=1.01$. (simulations)

droite : Pistes de mêmes dimensions, en germanium $\epsilon_r=29.8+7.3i$ (données expérimentales, sauf **(b)**)

Les résultats expérimentaux que nous obtenons dans ce chapitre permettent de tirer deux conclusions. Tout d'abord, la reconstruction de la carte de permittivité d'un objet à partir du champ qu'il diffracte peut être réalisée sans utiliser l'approximation de Born. Nous avons proposé pour cela un algorithme d'inversion itératif, faisant appel à un modèle rigoureux et qui s'est finalement montré plus efficace que des modèles d'inversion linéaires pour les objets que nous avons observés. En second lieu, nous avons montré que la diffusion multiple jouait un rôle important dans la limite de résolution de la tomographie optique de diffraction. La résolution qui peut être atteinte en prenant en compte de ce phénomène n'est plus fondamentalement limitée, si ce n'est par la structure même de l'échantillon qui joue un rôle important dans la formation du champ électromagnétique qui permet de « sonder » la permittivité de l'objet, et que l'observateur ne peut pas contrôler facilement s'il ne connaît pas cet objet. Nos résultats expérimentaux, obtenus avec des échantillons de permittivité relative élevée, montrent qu'il est possible que cette résolution dépasse largement ce que permet d'obtenir la synthèse d'ouverture de la tomographie dans le cadre de l'approximation de Born.

Nos expériences se sont limitées à des échantillons invariants dans une direction, pour pouvoir simplifier nos calculs et faire une démonstration de principe, mais notre équipe travaille actuellement à l'extension de cette technique à des échantillons 3D.

Chapitre III. Techniques d'éclairage structuré en microscopie de fluorescence

Résumé du chapitre

Dans ce chapitre, nous présentons une technique de microscopie à éclairage structuré (SIM pour Structured Illumination Microscopy) permettant d'imager des échantillons fluorescents avec une résolution bien meilleure que les microscopes large-champ classiques. Dans tout le chapitre, les échantillons sont supposés infiniment fins et placés au plan focal objet du microscope.

Nous détaillons tout d'abord le montage expérimental que nous avons mis en œuvre pour obtenir des images en éclairage structuré dans une configuration de réflexion totale interne. Ce travail est la première étape dans la conception d'un microscope TIRF (Total Internal reflection Microscope) à très haute résolution assisté par réseau, dont nous parlerons dans le chapitre suivant. L'échantillon est éclairé par une intensité lumineuse sinusoidale et évanescence provenant de l'interférence de deux faisceaux arrivant en réflexion totale interne à l'interface lamelle-air de l'objectif.

Puis, nous présentons le prétraitement des images et les techniques d'inversion permettant de reconstruire l'image finale. Nous introduisons notamment un algorithme d'inversion, développé au sein de notre équipe¹, capable de retrouver la densité de fluorescence de l'objet sans avoir aucune information *a priori* sur les motifs d'illuminations utilisés.

Enfin, l'efficacité de notre méthode de reconstruction est vérifiée sur des données expérimentales. Les images étudiées proviennent en premier lieu du montage SIM à éclairage périodique puis on considère le cas où les éclairages sont des speckles totalement incontrôlés. Nous montrons que notre approche permet de simplifier de manière spectaculaire le montage expérimental, tout en conservant un gain de résolution significatif.

¹ par Kamal Belkebir et Emeric Mudry

Introduction

La microscopie de fluorescence en champ large est une technique très utilisée pour l'étude d'échantillons et de phénomènes biologiques. Elle permet le marquage spécifique de structures d'intérêts, qui apparaissent avec un excellent contraste dans l'image finale. Elle reste cependant une technique de microscopie conventionnelle, reposant exclusivement sur l'agrandissement latéral du champ électrique formé par l'échantillon dans le plan focal objet. Sa résolution est donc limitée par la longueur d'onde et l'ouverture numérique de l'objectif utilisé (cf. section I.1.2), comme l'indique la formule d'Abbe [1]. De nombreuses méthodes existent cependant pour dépasser cette limite fondamentale. La plupart d'entre elles sont basées sur un éclairage inhomogène de l'échantillon. La plus répandue est probablement la microscopie confocale, qui consiste à éclairer l'échantillon en balayant un faisceau focalisé, tout en limitant la détection des photons émis en dehors du point de focalisation avec un pinhole. Si cette technique permet une amélioration significative de la résolution axiale, l'amélioration reste modeste dans les directions latérales [127,128]. En champ large, les techniques d'éclairage structuré permettent en revanche d'améliorer la résolution transverse avec plus d'efficacité. Celles-ci tirent parti de l'effet de Moiré qui se produit dans l'image d'un objet éclairé par un motif périodique, ce qui permet de reconstruire numériquement une image dont la résolution est potentiellement doublée (section I.2.3, p35). Cette idée a d'abord été utilisée pour obtenir un sectionnement optique en champ large [129], puis elle a été étendue à une amélioration de la résolution latérale [28,30], puis tridimensionnelle [130]. La formation d'une grille de lumière par interférence de faisceaux cohérents est aujourd'hui communément utilisée, car elle permet d'obtenir un motif fortement contrasté améliorant la qualité de l'image finale [131]. De nombreux montages ont pour cela été proposés [30,132,133]. Plus récemment, cette méthode a été combinée avec la microscopie de fluorescence en réflexion totale interne. Avec cette technique l'échantillon est éclairé sur une épaisseur de quelques dizaines de nanomètres seulement, par le champ évanescent provenant d'une onde plane totalement réfléchi sur une interface verre/air ou verre/eau [50,51]. L'échantillon est alors éclairé sur une épaisseur de seulement quelques dizaines de nanomètres, ce qui permet de filtrer efficacement la contribution des

zones éloignées de la surface qui sont hors-focus. Des résolutions proches de 100nm (pour un éclairage à 488nm) ont ainsi été montrées [134-137].

III.1. Montage expérimental pour éclairage structuré classique

La principale difficulté du montage de microscopie en éclairage structuré consiste à créer à la surface d'une lamelle une grille de lumière de période contrôlée (et aussi petite que possible), pouvant être translatée et tournée à volonté. Pour cela, nous faisons interférer deux faisceaux provenant d'un même laser, collimatés en sortie de l'objectif et symétriques par rapport à l'axe optique et de même puissance. Étant donné que nous considérons une configuration de réflexion totale interne, ceux-ci sont envoyés à travers un substrat de verre avec des angles d'incidence de $\pm \theta_{inc}$, avec $\theta_{inc} > \text{Arcsin}(n_1/n_2)$. La distribution de l'intensité à la surface du substrat de verre s'écrit alors :

$$I(\vec{r}) = e^{-\text{Im}\{2\Gamma_2(k_{\parallel inc})\}z} [1 + \cos(2\vec{k}_{\parallel inc} \cdot \vec{r}_{\parallel} + \Delta\phi)], \quad (\text{III.1-a})$$

avec
$$k_{\parallel inc} = \|\vec{k}_{\parallel inc}\| = \frac{2\pi \times n_2 \times \sin(\theta_{inc})}{\lambda_0} \quad (\text{III.1-b})$$

et
$$\Gamma_2(k_{\parallel inc}) = \sqrt{n_2^2 k_0^2 - k_{\parallel inc}^2}, \quad (\text{III.1-c})$$

où n_2 est l'indice du milieu au-dessus du substrat, λ_0 est la longueur d'onde dans le vide des faisceaux incidents et $\Delta\phi$ leur différence de phase.

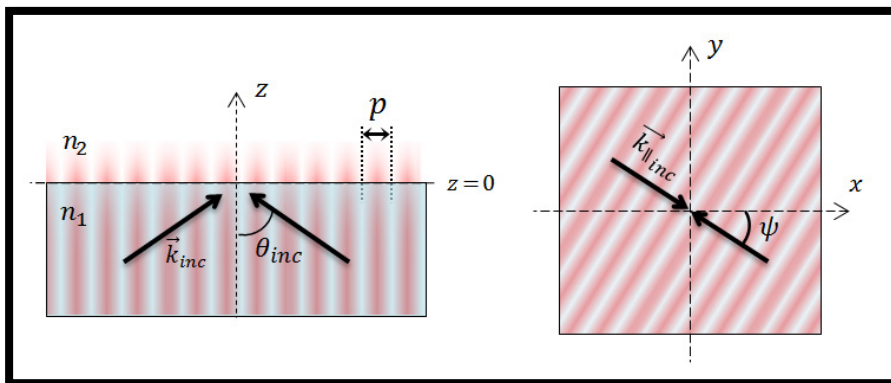


Figure III.1-1 :
Interférence de
deux ondes planes
en configuration
de réflexion totale
interne

Le montage expérimental doit permettre de contrôler l'angle polaire (θ_{inc}), le déphasage relatif ($\Delta\phi$) des deux faisceaux et l'angle azimutal (ψ) d'incidence des deux faisceaux à la surface du substrat dont dépendent respectivement la période, la position et l'orientation

du motif d'intensité. Pour cela, nous avons testé deux configurations différentes. La première, décrite plus en détail dans l'annexe A (p. 165), utilisait un modulateur spatial de lumière (comme proposé par [136]). En raison du fonctionnement instable de ce dernier, nous avons finalement opté pour un autre montage utilisant un simple réseau de diffraction unidimensionnel en transmission (similairement à [30]).

III.1.1. Montage avec réseau de diffraction « fixe » en transmission

Dans ce montage, l'obtention de deux faisceaux symétriques par rapport à l'axe optique se fait à l'aide d'un réseau 1D de diffraction en transmission, constitué de simples sillons gravés dans un substrat de verre. Notre montage se rapproche ainsi de celui proposé par Gustafsson en 2000 [30]. Les ordres de diffraction +1 et -1 obtenus avec le réseau (Edmund Optics, 80 grooves/mm Transmission Grating Beamsplitter) éclairé sous incidence normale forment des angles de $\pm 2.9^\circ$ avec l'axe optique. Nous avons choisi les focales des lentilles intermédiaires, placées entre l'objectif (Nikon Apo TIRF, x100, 1.49 oil) et le réseau, dans le but d'obtenir un angle d'incidence de 65° en sortie de l'objectif. Avec une distance focale équivalente de l'objectif de 2mm des focales de 45, 250 et 150 mm (dans l'ordre, du réseau vers l'objectif) nous permettent d'obtenir le bon angle.

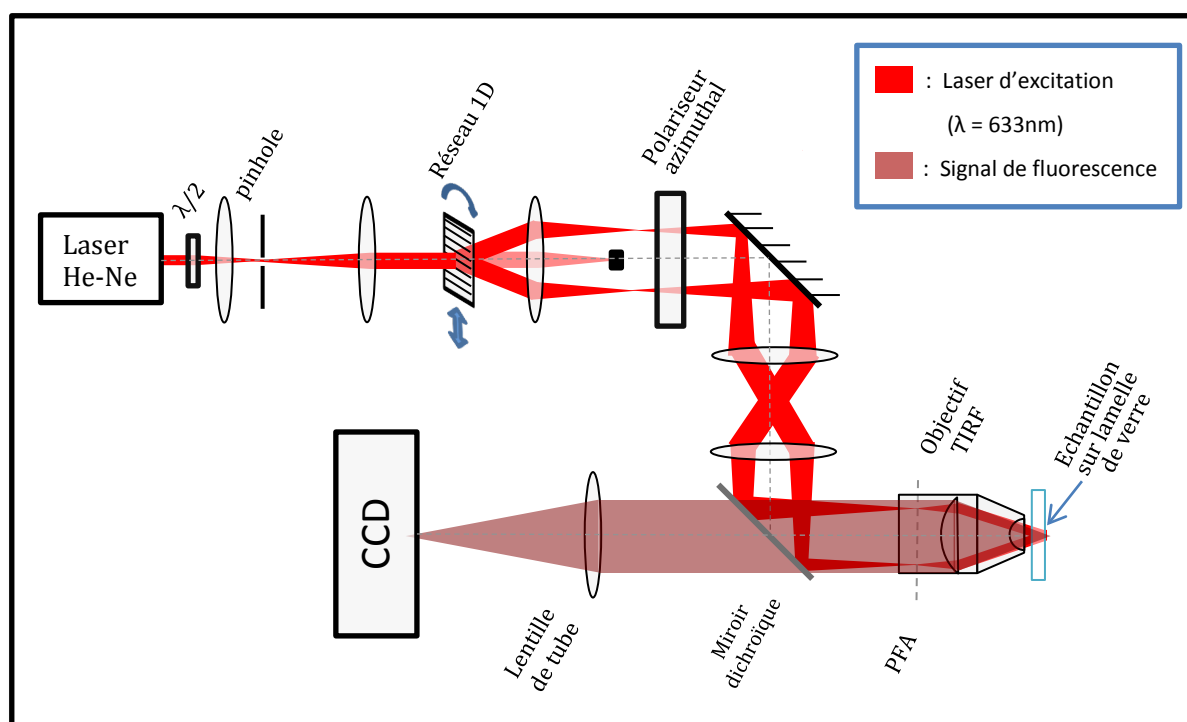


Figure III.1-2 - Schéma du montage optique utilisé

Pour que les faisceaux se croisent au niveau du plan focal objet de l'objectif, il est nécessaire de veiller à ce que les plans focaux des lentilles restent conjugués. Pour cette raison, l'angle d'incidence des faisceaux ne peut pas être ajusté aisément une fois le montage correctement réglé : la période de la grille est donc fixe.

Le réseau peut être translaté et tourné dans un plan perpendiculaire à l'axe optique, à l'aide de platines de translation et de rotation (Standa, 8MRU-1 et 8MT173-10). Celles-ci sont actionnées par des moteurs pas à pas, pilotés par un programme LabView. La grille de lumière formée au niveau de l'échantillon n'est finalement qu'une image du réseau de diffraction. Ainsi, une rotation subie par ce dernier change l'angle azimutal des deux faisceaux diffractés et tourne d'autant le motif d'illumination. La translation du réseau modifie la phase relative des deux faisceaux, et change la position de la grille de lumière. Grâce

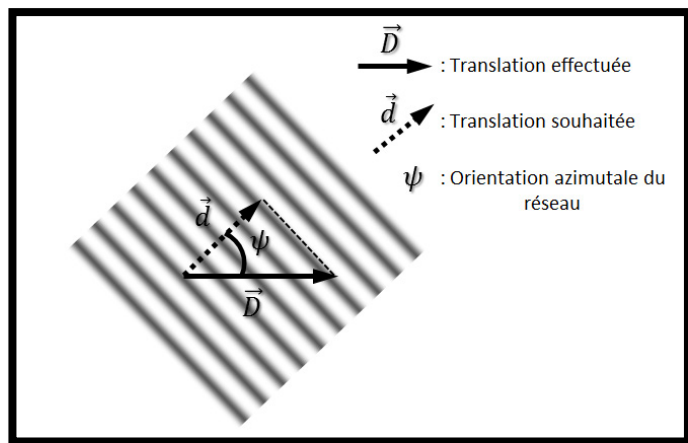


Figure III.1-3 : Déplacement de la grille de lumière par translation du réseau sur un seul axe

au grandissement qui existe entre le plan de l'échantillon et celui du réseau, un déplacement de la grille de lumière d'un tiers de période (environ 75 nm) correspond à un déplacement du réseau d'environ 4,16 μm , ce qui ne nécessite pas de platine piézo-électrique nanométrique pour être correctement effectué. En prenant en compte un facteur de projection ($1/\cos(\varphi)$), nous pouvons nous servir d'un seul axe de translation pour les déplacements de la grille de lumière. Nous devons toutefois éviter les angles azimutaux proches de 90° , pour lesquels le facteur de projection devient trop sensible à de petites erreurs d'angle.

Les translations du motif d'illumination pouvaient également être assurées par une platine de positionnement piézo-électrique (MadCityLabs, Nano-LPS100), sur laquelle est posé l'échantillon. Également pilotée avec un programme Labview, celle-ci est capable d'effectuer des déplacements dans les trois directions de l'espace, avec une précision de quelques nanomètres. Par changement de repère, on peut se convaincre qu'une translation de l'échantillon sur une grille de lumière fixe est strictement équivalente à une translation de la grille par rapport à l'échantillon. Les déplacements de l'échantillon doivent alors être

corrigés sur les mesures brutes, puisque l'algorithme d'inversion que nous utilisons suppose que l'objet est immobile sur l'ensemble des images. La connaissance *a priori* de ces déplacements est cependant incertaine : lors de la calibration de la platine, nous avons observé que de petits déplacements successifs n'étaient pas toujours parfaitement reproductibles. L'estimation de ces déplacements est également difficile *a posteriori*, car la présence d'une illumination inhomogène perturbe notre algorithme de correction, basé sur des cross-corrélations des images. Nous avons donc finalement privilégié la première solution qui n'implique pas de déplacements de l'objet observé.

III.1.2. Gestion de la polarisation des faisceaux incidents

L'effet de Moiré qui nous permet d'obtenir une image super-résolue est d'autant plus fort que le contraste de la grille de lumière utilisée est important. Pour que leur interférence produise une modulation optimale de l'intensité lumineuse, il faut que le champ électrique de chaque faisceau soit orienté dans la même direction. Dans notre configuration, cela correspond nécessairement au cas transverse électrique (TE ou s) : leur polarisation doit être rectiligne et orientée dans la direction perpendiculaire au plan d'incidence. Cela est très facile à réaliser pour une orientation fixe du réseau de diffraction : il suffit d'ajuster l'orientation de la polarisation linéaire du faisceau laser avec une lame demi-onde. Nous souhaitons cependant réaliser la même chose pour toutes les orientations (ψ) possibles du réseau de diffraction. Une première solution évidente est de faire tourner la lame demi-onde en même temps que le réseau. Malheureusement, la direction de polarisation du laser subit une rotation de 2ψ lorsque la lame est tournée d'un angle ψ . Il faudrait donc que cette lame subisse une rotation différente du réseau, nécessitant l'utilisation (et l'achat) d'une seconde platine de rotation pour pouvoir automatiser les mesures avec un ordinateur. Pour résoudre ce problème, nous aurions également pu utiliser une lame quart d'onde, afin d'obtenir une polarisation circulaire du faisceau laser, puis sélectionner la polarisation linéaire adéquate à l'aide d'un simple polariseur en transmission, attaché au réseau de diffraction. Cette solution élégante et stable implique cependant de perdre systématiquement la moitié de la puissance initiale du laser, ce que nous ne pouvons pas nous permettre.

Nous avons finalement choisi une troisième solution, utilisant un composant à cristaux liquide (Arcoptix, Radial-Azimuthal Polarization Converter). Celui-ci est destiné à modifier la polarisation à l'intérieur d'un faisceau gaussien dans lequel elle est initialement linéaire. Pour cela, le faisceau traverse une matrice de cristaux liquides, dont l'orientation est plus ou moins « torsadée » en fonction de leur position par rapport à l'axe optique. Ainsi, selon la direction de polarisation initiale du faisceau, on obtient en sortie une distribution de polarisation radiale ou azimuthale (cf. Figure III.1-4). Dans la configuration « azimuthale », on remarque que le champ électrique est toujours tangent à un cercle centré sur l'axe optique. Cela correspond exactement à ce que nous cherchons à obtenir pour que nos deux faisceaux d'éclairage soient en polarisation *s* quelle que soit leur orientation. Nous avons donc placé cet appareil dans un plan de focalisation des deux faisceaux diffractés par le réseau, juste après la lentille L1. La zone du convertisseur de polarisation traversée par ces faisceaux focalisés est donc différente selon l'orientation et permet la rotation adéquate de leur champ électrique pour obtenir systématiquement une polarisation *s*.

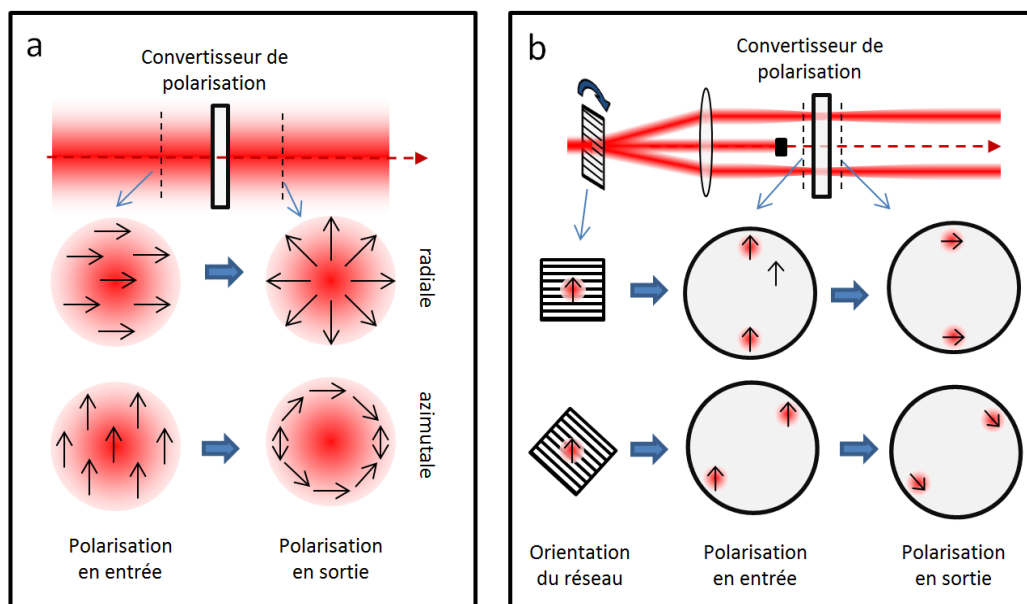


Figure III.1-4 : Convertisseur de polarisation à cristaux liquides – Utilisation normale (a) et détournée pour le montage (b)

Entre les lentilles L1 et L2, nous avons placé un miroir diélectrique pour diriger le laser vers l'entrée arrière du statif de microscope que nous utilisons. La réflexion à 45° sur ce miroir ainsi que la suivante sur le dichroïque peuvent perturber la polarisation de faisceaux réfléchis. En effet, le déphasage à la réflexion n'est pas le même pour les composantes *s* et *p*

du champ électrique. Lorsque le faisceau est polarisé linéairement selon une direction qui n'est ni horizontale, ni verticale, un retard d'une composante par rapport à l'autre change une polarisation linéaire en polarisation elliptique. Après avoir estimé ce déphasage entre les deux composantes à l'aide de polariseurs rectilignes, nous avons constaté qu'il était proche de $\pi/2$. L'insertion d'une lame quart d'onde entre le miroir et le convertisseur de polarisation nous a permis de pré-compenser ce déphasage, et de maintenir une polarisation linéaire des deux faisceaux au niveau de l'objectif, pour toute orientation du réseau de diffraction.

Une fois ces réglages effectués, nous vérifions la période, l'orientation et le contraste de la grille de lumière formée, nous observons la réflexion du laser à la surface du substrat : une partie de cette réflexion traverse le miroir dichroïque et reproduit la grille de lumière sur le capteur de la caméra, au grandissement près.

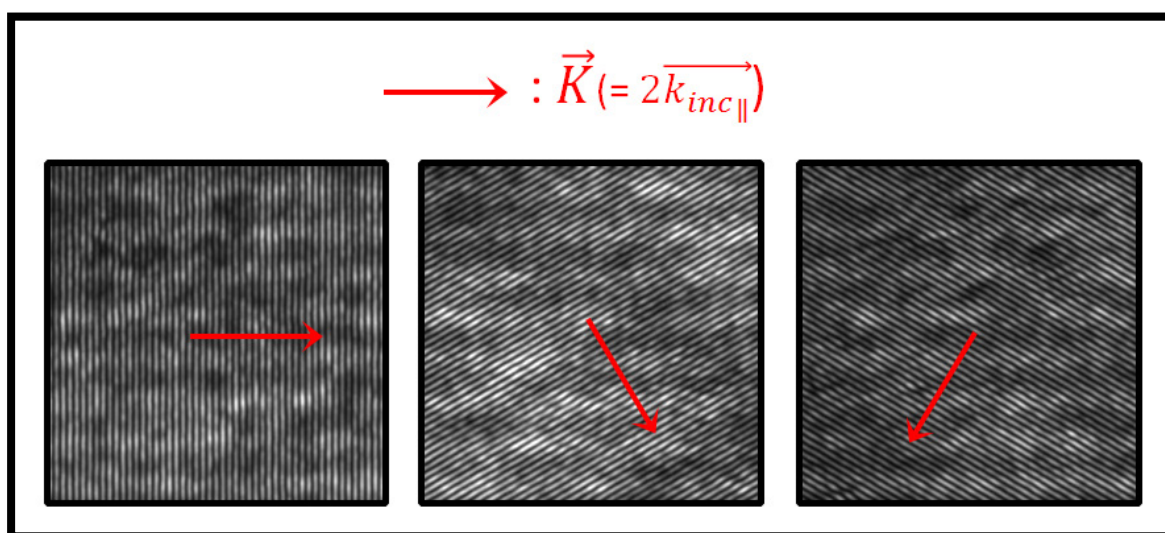


Figure III.1-5 : Observation de la grille de lumière formée à la surface de la lamelle de verre, pour trois orientations différentes de la grille (0, 60, 120°). L'image est formée sur la caméra par la réflexion du laser sur la lamelle.

III.1.3. Détection du signal

Plusieurs modèles de caméra ont été utilisées sur ce montage au cours des trois années, mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec une caméra EMCCD (Andor iXon). Très sensible et refroidie (à environ -100°C), elle permet d'obtenir un rapport signal à bruit convenable, même lorsque le signal de fluorescence émis par l'échantillon est de faible intensité.

Les images de fluorescence en champ large obtenues sont limitées en résolution par le phénomène de diffraction. La plus haute fréquence détectable est donnée par le critère d'Abbe :

$$f_{max} = 2NA/\lambda_{flu} \approx 2 \times 1.49/650 \text{ nm}^{-1}, \quad (\text{III.1-d})$$

Si l'on considère que les fluorophores excités par notre laser à 633nm ont un spectre d'émission centré sur 650nm, en raison du décalage de Stokes [20]. NA est l'ouverture numérique de notre objectif, soit 1.49. Pour ne pas perdre d'informations fréquentielles lors de la pixellisation de l'image, le critère de Shannon (ou Nyquist) doit être respecté. La taille des pixels doit donc être inférieure ou égale à la moitié de la période correspondante à f_{max} , après prise en compte du grandissement:

$$d_{max} \leq \lambda_{flu}/(4NA) \approx 109 \text{ nm}. \quad (\text{III.1-e})$$

Les pixels de la caméra EMCCD font $16\mu\text{m}$ de côté, équivalents à 160nm dans le plan de l'échantillon avec le grandissement $\times 100$ de l'objectif. Ils ne respectent donc pas le critère de Shannon. Pour remédier à ce problème, nous avons ajouté une lentille en sortie du microscope, afin d'augmenter le grandissement total du microscope. Cette lentille a été choisie pour obtenir une taille des pixels légèrement inférieure à d_{max} . Un grandissement trop important limiterait inutilement [138] le champ de vue et le nombre de photons par pixel. Un doublet achromatique (Newport) de $76,2\text{mm}$ de focale nous a paru être un bon compromis entre un montage compact et une limitation des aberrations introduites par les lentilles de focale courte. Le grandissement final est calibré à l'aide d'une mire graduée tous les $2\mu\text{m}$ à chaque modification du montage. Typiquement, la taille des pixels virtuels était proche de 100nm .

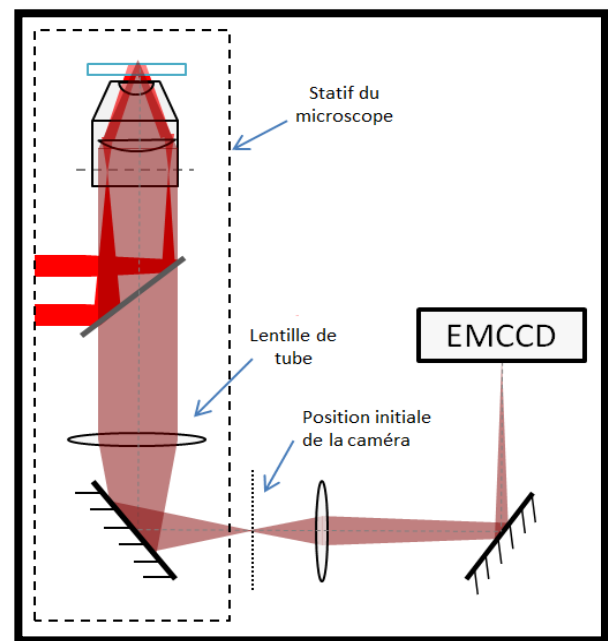


Figure III.1-6 :
Positionnement de la caméra

III.1.4. Protocole d'acquisition du set d'images

Nous enregistrons généralement 12 images pour obtenir une image super-résolue : 4 translations du motif pour chacune des trois orientations. La caméra EMCCD, les platines de translation et rotation du réseau en transmission et la platine de positionnement nanométrique 3D de l'échantillon sont pilotés à l'aide d'un même programme Labview, qui synchronise

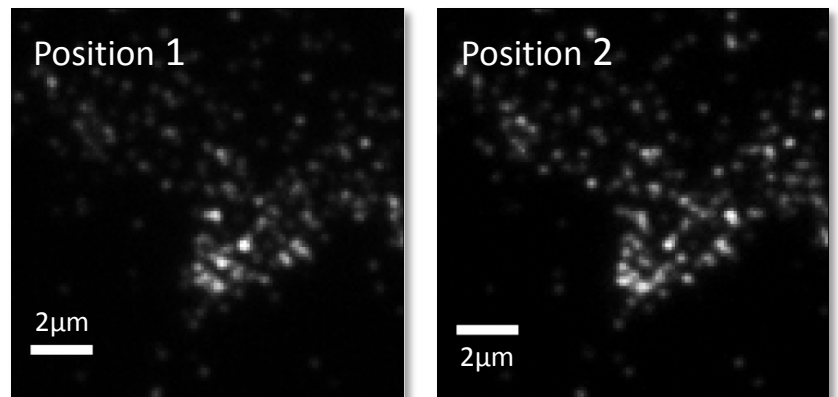


Figure III.1-7 : Images de billes fluorescentes obtenues pour deux positions de grille différentes

Une observation attentive montre que certaines billes sont bien éclairées pour une position de grille donnée, mais pas pour l'autre

l'acquisition des images, la rotation du réseau et sa translation (ou celle de l'échantillon dans certains cas). Un nombre important de mesures ont été réalisées avant l'achat de la platine de rotation motorisée ; le réseau était alors tourné manuellement, ce qui ralentissait considérablement la durée totale d'acquisition. Avant chaque mesure, nous essayons de régler de manière optimale le plan de focalisation de l'objectif, et de corriger les aberrations sphériques qui peuvent dégrader la PSF. L'objectif utilisé dispose d'une bague d'adaptation à différentes épaisseurs de lamelles de verre. Selon la température ambiante et les lamelles utilisées, le réglage optimal n'était pas toujours dans l'intervalle accessible avec cette bague. Pour y remédier, nous avons ajusté l'indice optique de l'huile d'immersion, ce qui permet de compenser les aberrations sphériques qui peuvent subsister [139,140]. Nous avons pour cela utilisé deux huiles d'indice légèrement différents (Cargille type 1160, $n=1.483$ et 1.535) que nous avons mélangées selon différents rapports volumiques. Après plusieurs essais, nous avons obtenu un mélange dont l'indice optique permettait un réglage optimal lorsque la bague de l'objectif était à peu près en milieu de course.

III.2. Traitement des images avant inversion

Avant d'être traitées par l'algorithme d'inversion, les images brutes que nous mesurons nécessitent certains traitements. Le modèle de formation de l'image sur lequel se basent nos algorithmes d'inversion nécessite une densité de fluorescence stable pendant l'acquisition ainsi que la proportionnalité entre la valeur des pixels de l'image et le nombre de photons reçus sur le pixel correspondant du capteur. Une bonne connaissance de la PSF est également requise, ainsi qu'un échantillonnage suffisant de l'image pour atteindre la résolution attendue.

III.2.1. Estimation de la PSF du microscope

Avant ou après chaque série d'acquisition, nous avons pris des images de molécules ou de billes fluorescentes accrochées à la surface du substrat de verre, pour obtenir une « mesure » de la fonction d'étalement du point. Si de tels objets « ponctuels » ne sont pas visibles, nous pouvons éclairer une zone de fluorescence faible, homogène et éloignée de l'objet d'intérêt, jusqu'à ce que la plupart des marqueurs soient photoblanchis et que ceux qui émettent encore un signal soient pour la plupart bien isolés. Un temps d'exposition long (autour d'une seconde) et/ou une augmentation du gain de la caméra EMCCD étaient généralement nécessaires pour obtenir un signal raisonnable. Une fois de telles images enregistrées, nous pouvions estimer la PSF (2D) de l'appareil. Cela se fait en « moyennant » les images d'objets ponctuels isolés, à l'aide d'un algorithme Matlab fourni par Rainer Heintzmann. Celui-ci fonctionne de la manière suivante :

- L'utilisateur entre grossièrement les coordonnées de billes ou de fluorophores isolés dans l'image, en cliquant directement dessus. Des images carrées de quelques pixels de côté (taille choisie par l'utilisateur) sont ainsi extraites. Elles contiennent chacune une « mesure » de PSF.

- Ces images sont ensuite recalées les unes par rapport aux autres avec une précision *sub-pixel*. (cf. III.2.3)

-L'algorithme fait ensuite la somme de ces images recalées pour obtenir une mesure « moyenne » de la PSF. Cette moyenne est finalement recentrée puis normalisée.

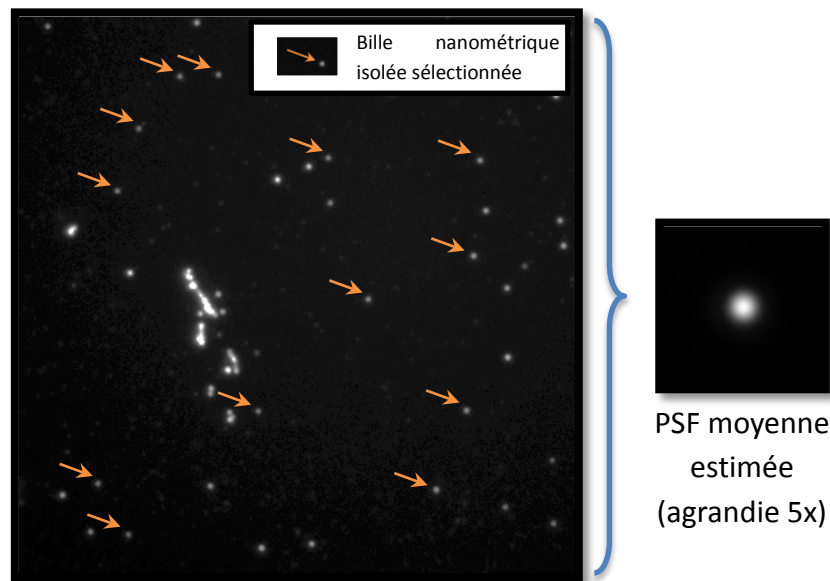


Figure III.2-1 : Estimation de la PSF à partir de l'image de billes isolées collées au substrat

III.2.2. Correction du fond

Pour assurer la linéarité de la relation entre la valeur prise par les pixels de l'image et l'intensité lumineuse réellement reçue par le capteur, quelques précautions sont nécessaires. Les capteurs CCD et EMCCD ont un niveau de signal de base non-nul, correspondant au « signal sombre ». Ce signal est créé par l'énergie thermique qui peut être responsable de la création d'électrons sur les pixels du capteur sans absorption de photon. Ce signal augmente avec la température du capteur et le temps d'exposition utilisé. S'il est réellement visible pour des mesures effectuées avec des caméras CCD « classiques », non-refroidies, il est généralement très faible pour une caméra EMCCD refroidie, sans qu'on puisse toutefois le négliger.

Pour le corriger, plusieurs images sont enregistrées dans les mêmes conditions que la mesure réelle, mais avec le laser d'excitation éteint. En soustrayant la moyenne de ces images à celles qui seront traitées, on enlève un « fond » qui constituerait un biais par rapport à notre modèle.

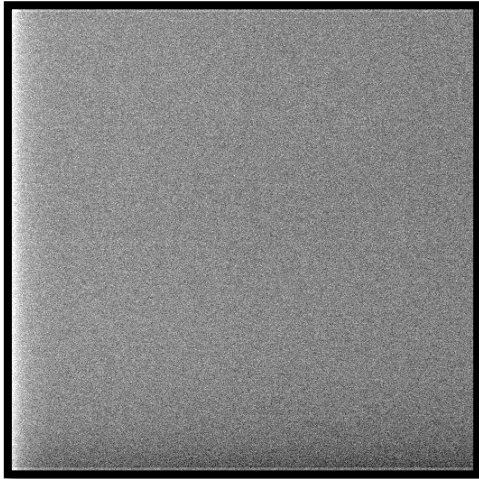


Figure III.2-2 : Fond moyen mesuré sans excitation, retranché aux mesures avant l'inversion.

La luminosité a été fortement rehaussée sur cette image : avec la caméra EMCCD, le niveau moyen du fond est typiquement 20 fois plus faible que le niveau de signal de nos mesures

III.2.3. Correction de la dérive de l'échantillon

Tous les algorithmes d'inversion utilisés supposent que l'échantillon est resté immobile pendant l'entière acquisition d'un set¹ d'images. En pratique, l'échantillon subit toujours des déplacements. Qu'ils soient volontairement effectués avec la platine nanométrique (pour « balayer » l'échantillon avec un motif d'illumination fixe) ou plus couramment causés par la dérive thermique d'éléments du montage (porte-échantillon, caméra, lentilles intermédiaires...), ces déplacements doivent donc être corrigés avant l'inversion des données. Pour cela, nous utilisons la suite de fonctions Matlab destinée au traitement d'image, appelée « Dip Image² ». La première fonction, estime le décalage de chaque image du set par rapport à une image de référence, avec une précision *sub*-pixel [141]. Dans notre cas, l'image obtenue avec un éclairage homogène, ou la somme de toutes les images du set servent d'image de référence. Pour corriger ce décalage ($\vec{d} = (d_x, d_y)$), nous effectuons

¹ Nous appelons « set » un ensemble d'images mesurées avec différents motifs d'illumination, nécessaires à la reconstruction super-résolue de l'objet fluorescent.

² <http://www.diplib.org>

la transformée de Fourier de l'image initiale, multiplions le résultat par un terme de phase, et retournons dans l'espace direct avec une transformée de Fourier inverse :

$$M_{corrigée}(x, y) = TF[TF^{-1}[M_{initiale}(x, y)] \times e^{-id_x\alpha} \times e^{-id_y\beta}]. \quad (\text{III.2-a})$$

De cette manière, nous pouvons corriger n'importe quel décalage de l'image, même si celui-ci ne correspond pas à un nombre entier de pixels. Cette méthode peut toutefois créer des artefacts, en particulier sur les bords de l'image, à cause de l'utilisation de transformées de Fourier rapides, qui supposent que l'image est périodique.

III.2.4. Sur-échantillonnage de l'image

La taille (virtuelle) des pixels dans les images brutes a été ajustée pour respecter le critère de Shannon, d'après la limite de résolution classique donnée par la limite d'Abbe. Après reconstruction, nous espérons obtenir une résolution deux fois meilleure : il faut donc que l'image finale soit décrite avec au moins deux fois plus de pixels. Les algorithmes d'inversion que nous avons utilisés ne sont pas encore optimisés pour reconstruire une image super-résolue constituée d'un nombre de pixels différent des images du set. Nous avons donc dû augmenter l'échantillonnage des images brutes avant la reconstruction. Pour diviser par deux (ou plus) la taille des pixels sans modifier les informations spectrales contenues dans l'image de départ, nous avons modifié les images dans l'espace de Fourier. En effet, ajouter des zéros sur les bords de la transformée de Fourier rapide de l'image permet, après une transformée de Fourier rapide inverse, d'obtenir une nouvelle image « sur-échantillonnée ». Le nombre de pixels final est égal au nombre de pixels de l'image initiale, plus le nombre de zéro ajoutés sur les bords de sa transformée de Fourier rapide.

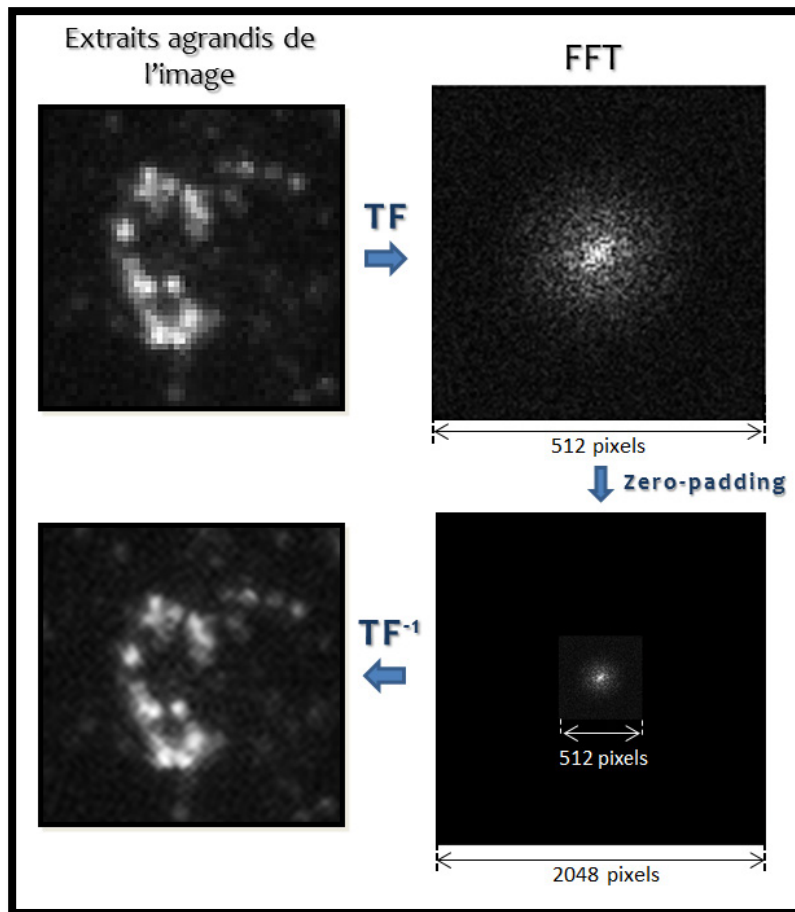


Figure III.2-3 :

Sur-échantillonnage de l'image par *zero-padding* dans l'espace de Fourier

III.3. Méthodes d'inversion

Comme pour la tomographie optique de diffraction, la synthèse d'ouverture réalisée par éclairage structuré en microscopie de fluorescence nécessite de « combiner » l'information contenue dans plusieurs images, correspondant à différents éclairagements. Un traitement numérique est donc nécessaire pour reconstituer une image « super-résolue » de l'objet à partir des mesures. En ce sens, ce traitement peut être qualifié de méthode d'inversion.

III.3.1. Algorithmes d'inversion classiques

L'équation reliant l'image M_l obtenue à l'objet ρ et à son éclairage I est assez simple pour la microscopie de fluorescence en champ large (cf. section I.1.4 p24) :

$$M(x, y) \propto [\rho(x, y) \times I(x, y)] * PSF(x, y). \quad (\text{III.3-a})$$

Comme nous l'avons montré dans le premier chapitre, lorsque la fonction d'illumination est de forme sinusoïdale, la transformée de Fourier de l'image correspondante contient plusieurs parties translatées du spectre de la fonction ρ (densité de fluorophores) que nous cherchons à estimer :

$$\tilde{M}(\alpha, \beta) \propto (\tilde{\rho}(\alpha, \beta) * \tilde{I}(\alpha, \beta)) \times OTF(\alpha, \beta), \quad (\text{III.3-b})$$

$$\text{soit } \tilde{M}(\alpha, \beta) \propto \left[\tilde{\rho}(\alpha, \beta) + \frac{1}{2} \left(e^{i\phi} \tilde{\rho}(\alpha + K_x, \beta + K_y) + e^{-i\phi} \tilde{\rho}(\alpha - K_x, \beta - K_y) \right) \right] \times OTF(\alpha, \beta) \quad (\text{III.3-c})$$

$$\text{si } I(x, y) = 1 + \cos(K_x x + K_y y + \phi) = 1 + \cos(\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}_{\parallel} + \phi). \quad (\text{III.3-d})$$

Pour séparer les trois composantes $\tilde{\rho}(\mathbf{k} + \mathbf{K}) \times OTF(\mathbf{k})$, $\tilde{\rho}(\mathbf{k} - \mathbf{K}) \times OTF(\mathbf{k})$ et $\tilde{\rho}(\mathbf{k}) \times OTF(\mathbf{k})$, une simple combinaison algébrique de trois images obtenues pour des positions de la grille bien définies est suffisante [132,142]. Plus généralement, en prenant trois images obtenues avec des translations régulières du motif d'illumination (*i.e.* pour $\varphi_n = \varphi_0 + n\Delta\varphi$, avec $n = 0, 1, 2$) on constitue un système de 3 équations à 3 inconnues, que l'on peut résoudre par une inversion de matrice (*cf.* [131,143])

Une fois cette étape réalisée pour plusieurs orientations de la grille¹, il reste à replacer les fragments d'informations spectrales à leur place, puis à effectuer une transformée de Fourier inverse du spectre élargi pour obtenir une image super-résolue. Lors de cette étape, il est également possible de compenser l'atténuation de certaines fréquences lors de la multiplication par la fonction de transfert du microscope. Ce procédé d'« apodisation » correspond en fait à une déconvolution linéaire de l'image. Il doit être ajusté en fonction du niveau de bruit, pour en limiter l'influence dans l'image reconstruite [92,144].

Pour que cette approche « analytique » de l'inversion fonctionne, il faut que le motif d'illumination de l'échantillon soit parfaitement maîtrisé : une erreur d'orientation, de période ou de translation de la grille de lumière est susceptible de générer des artefacts importants dans l'image reconstituée. Il est cependant possible de limiter ce problème en laissant des degrés de liberté dans la définition de la fonction d'illumination considérée. Pour cela, celle-ci est considérée comme une fonction paramétrique (les paramètres étant par exemple l'orientation, la position, la période de la grille) que l'on pourra ajuster à partir

¹ Ce qui est nécessaire pour obtenir un résultat quasi-isotrope.

d'informations a priori [143,144], ou en effectuant simplement des cross-corrélations sur les transformées de Fourier des images obtenues [30,92,131].

III.3.2. Estimation de la densité de fluorophores par gradient conjugué

Forts de l'expérience de notre équipe dans la résolution des problèmes inverses, notamment appliqués à l'imagerie par diffraction (cf. chapitre 2), nous avons transposé cette approche non-analytique à la reconstruction d'image par éclairage structuré en microscopie de fluorescence [145,146]. L'algorithme que nous présentons ici a été principalement développé par Kamal Belkebir. Le problème direct est beaucoup plus simple qu'en tomographie de diffraction, car il est bilinéaire en p et en I . Pour plus de simplicité, nous réécrivons l'équation (III.3-a) avec une notation symbolique :

$$M = HI\rho. \quad (\text{III.3-e})$$

M est l'image obtenue pour une fonction d'illumination I et un objet fluorescent défini par sa densité de fluorescence ρ . H est un opérateur de convolution avec la PSF du microscope.

Minimisation itérative de la fonction coût

Comme dans le cadre de la tomographie optique de diffraction, le problème inverse est reformulé en terme de minimisation d'une fonction coût F , exprimant l'écart entre la mesure et l'image produite par une estimation de l'objet selon le modèle direct, pour chacune des L illuminations :

$$F(\rho_n) = \sum_{l=1}^L \|M_l - HI_l\rho_n\|^2, \quad \text{pour } l = 1 \dots L. \quad (\text{III.3-f})$$

M_l correspond à l'image mesurée pour un éclairage donné par I_l . ρ_n est la n -ième estimation de la densité de fluorescence. Afin de minimiser $F(\rho_n)$, nous faisons évoluer ρ_n de manière itérative :

$$\rho_n = \rho_{n-1} + \alpha_n d_n^p. \quad (\text{III.3-g})$$

Dans le terme correctif, d_n^p désigne la direction de descente. Elle se calcule de la manière suivante :

$$d_n^p = g_n^p + \gamma_{n,p} d_{n-1}^p \quad (\text{III.3-h})$$

$$\text{avec} \quad \gamma_{n,p} = \frac{\langle g_n^p | g_{n-1}^p \rangle}{\|g_{n-1}^p\|^2}. \quad (\text{III.3-i})$$

g_n^p est le gradient de la fonction coût F par rapport à la densité de fluorescence. Il s'écrit :

$$g_n^p = - \sum_{l=1}^L I_l \mathbf{H}^\dagger (M_l - \mathbf{H} I_l \rho_{n-1}), \quad (\text{III.3-j})$$

où \mathbf{H}^\dagger désigne l'opérateur adjoint de \mathbf{H} . Comme nous pouvons le constater dans l'équation ci-dessus, un nouveau gradient est calculé chaque itération, en utilisant l'estimation $n-1$ de la densité de fluorescence. α_n est un scalaire qui permet de pondérer la correction apporté à l'estimation précédente (cf. section II.2.2).

Informations *a priori*

Nous avons également la possibilité d'ajouter des informations *a priori* dans l'algorithme, afin de faciliter sa convergence vers une solution conforme à la réalité[61,147]. La densité de fluorescence ne pouvant physiquement pas prendre de valeurs négatives, nous avons notamment choisi forcer la positivité de ρ_n . Nous l'exprimons pour cela comme le carré d'une fonction intermédiaire v_n que nous estimerons à sa place. Les équations (III.3-g), (III.3-h) et (III.3-i) doivent dans ce cas être réécrites en remplaçant les ρ par des v . De plus, l'équation (III.3-j) devient :

$$g_{n,v} = - \sum_{l=1}^L I_l v_{n-1} \mathbf{H}^\dagger (M_l - \mathbf{H} I_l v_{n-1}^2). \quad (\text{III.3-k})$$

Estimation initiale de la densité de fluorescence

De manière intuitive, l'image obtenue avec une mesure en champ large classique fournit une première estimation correcte de la densité de fluorescence que nous souhaitons retrouver. Pour une illumination homogène, celle-ci s'écrit :

$$M_{WF} = I_0 \rho * PSF + \epsilon, \quad (\text{III.3-l})$$

où ϵ désigne le bruit de la mesure et I_0 l'intensité de l'illumination. Au bruit près, elle contient donc les basses fréquences de ρ qui n'ont pas été filtrées par la convolution avec la PSF. Pour cette raison, nous l'utilisons comme estimation de départ de la densité de

fluorescence, ρ_0 . Lorsqu'une image avec éclairage homogène de l'échantillon n'est pas disponible, nous utilisons à la place la moyenne des images obtenues pour les différentes illuminations :

$$M'_{WF} = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L (I_l \rho) * PSF + \epsilon_l. \quad (\text{III.3-m})$$

Puisque les différents motifs d'illuminations sont choisis pour que leur somme soit égale à une fonction homogène, les deux approches sont équivalentes.

Discussion

Cette méthode d'inversion, testée sur des données simulées [145,146], donne de bons résultats à condition que les fonctions d'illumination (I_l) et la réponse impulsionnelle du microscope (PSF) soient connues. Dans les cas expérimentaux cependant, il est improbable qu'ils soient parfaitement maîtrisés et les erreurs commises peuvent conduire à un résultat faussé, en particulier par la formation d'artéfacts. Comme pour les algorithmes d'inversion « classiques » présentés précédemment, il serait possible de représenter les fonctions d'illumination et/ou la PSF de détection du microscope par des fonctions paramétriques. L'estimation de ces paramètres pourrait alors être réalisée par un gradient conjugué, ou toute autre méthode de minimisation d'une fonction coût, avec ou sans introduction d'informations *a priori*. Plusieurs algorithmes ont par exemple été proposés pour déconvoluer une image lorsque la réponse impulsionnelle est mal connue (cf. par exemple [148,149]).

Notons enfin que notre algorithme effectue systématiquement une « déconvolution » de l'image par la PSF. En effet, le modèle qui sert de base au calcul de la fonction coût de notre algorithme prend en compte la convolution par la PSF, et l'atténuation des hautes fréquences qui en résulte. Pour minimiser la valeur de cette fonction coût, l'algorithme doit donc trouver une image (ou plutôt une densité de fluorophores) dont les hautes fréquences correspondent, après convolution avec la PSF, à celles observées dans les données. Ainsi, traiter avec notre algorithme une image obtenue avec un éclairage homogène revient à faire une déconvolution itérative de celle-ci, et permet d'améliorer son contraste, voire sa résolution en raison de l'introduction d'informations *a priori* (comme la positivité)¹ (cf.

¹ cf. section I.3.2 et [61] par exemple

section I.3.2, p39). Il est donc inutile de traiter les images que nous obtenons par une « apodisation » supplémentaire, comme cela était souhaitable avec les techniques d'inversion analytique présentées précédemment (cf. section III.3.1).

III.3.3. Estimation conjointe de la densité de fluorophores et des fonctions d'éclairement par gradient conjugué

Représenter les fonctions d'illumination par des fonctions paramétriques n'est pas toujours suffisant pour obtenir des résultats satisfaisants en éclairage structuré. Lorsque les difficultés expérimentales (aberrations du système optique d'illumination, irrégularités du substrat ou de l'échantillon lui-même, mauvaise calibration de la période de la grille utilisée *etc.*) provoquent des déformations du champ incident et que la grille de lumière est trop éloignée de celle attendue, il est probable que l'inversion échoue à donner une image super-résolue et sans artéfacts. Nous avons utilisé une version modifiée de l'algorithme d'inversion présenté précédemment, qui permet de retrouver simultanément la fonction objet (*i.e.* la densité de fluorescence ρ) et les fonctions d'illumination (les I_l), en utilisant une connaissance *a priori* sur la moyenne de ces dernières. Le travail d'optimisation de cet algorithme a été effectué par Emeric Mudry, assisté par Kamal Belkebir.

Algorithme

L'approche reste la même : nous souhaitons minimiser une fonction coût représentant l'écart, d'après notre modèle direct, entre les L mesures (images) et les estimations de ces fonctions :

$$F(\rho_n, I_{l,n}) = \sum_{l=1}^L \|M_l - \mathbf{H}I_{l,n}\rho_n\|^2. \quad (\text{III.3-n})$$

La différence avec l'algorithme précédent se situe dans le fait que cette fonction coût dépend à la fois de ρ_n et de l'estimation des L fonctions d'illumination. Le problème est alors sous-déterminé : nous avons $L + 1$ inconnues pour seulement L mesures et donc L équations

algébriques. Celles-ci correspondent aux L termes de la somme qui définit la fonction coût. Pour y remédier, nous avons ajouté une équation de contrainte a priori sur les illuminations : leur moyenne est supposée connue et égale I_0 . On obtient alors le système suivant :

$$M_l(x, y) = [I_l(x, y) \times \rho(x, y)] * PSF(x, y) \quad \text{pour } l = 1 \dots L \quad (\text{III.3-o})$$

et

$$\frac{1}{L} \sum_{l=1}^L I_l(x, y) = I_0(x, y), \quad (\text{III.3-p})$$

soit effectivement $L + 1$ équations pour $L + 1$ inconnues. La fonction coût est modifiée en conséquence :

$$F(\rho_n, I_{l,n}) = \sum_{l=1}^L \|M_l - H I_{l,n} \rho_n\|^2 + C \left\| I_0 - \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L I_{l,n} \right\|^2, \quad (\text{III.3-q})$$

où C est une constante. Pour une estimation parfaite des toutes les fonctions inconnues, le premier terme correspond au bruit des mesures. Le second terme représente quant à lui la justesse de notre estimation *a priori* de l'illumination moyenne. Si les I_l sont parfaitement estimés, ce terme donne l'écart entre la moyenne réelle des illuminations et celle que nous avons choisie. En pratique, la moyenne des illuminations était généralement supposée homogène ($I_0 = \text{constante}$). Le second terme représente alors l'inhomogénéité réelle de la fonction d'illumination moyenne. La valeur de la constante C permet d'équilibrer l'influence de ces deux termes dans la fonction coût. Elle doit donc être choisie en fonction du rapport attendu entre le bruit moyen d'un jeu de mesures et l'inhomogénéité attendue de la moyenne des illuminations.

Cette fois encore, les estimations ρ_n et $I_{l,n}$ sont modifiées itérativement, pour minimiser la fonction coût. L'intensité lumineuse incidente étant nécessairement positive, nous ajoutons une contrainte de positivité en utilisant des fonctions réelles ζ_l^{inc} intermédiaires, et en posant $I_l = \zeta_l^2$. On estime les $L+1$ inconnues de manière itérative :

$$v_n = v_{n-1} + \alpha_n d_n^v \quad (\text{avec } \rho_n = v_n^2) \quad (\text{III.3-r})$$

$$\zeta_{l,n} = \zeta_{l,n-1} + \beta_{l,n} d_{l,n}^\zeta \quad \text{pour } l = 1, \dots, L \quad (\text{III.3-s})$$

Les directions de descente pour les $\zeta_{l,n}^{inc}$ sont calculées de la manière suivante :

$$d_{l,n}^{\zeta} = g_{l,n,\zeta} + \gamma_{l,n,\zeta} d_{l,n-1,\zeta} \quad (\text{III.3-t})$$

avec

$$\gamma_{l,n,\zeta} = \frac{\langle g_{l,n,\zeta} | g_{l,n-1,\zeta} \rangle}{\|g_{l,n-1,\zeta}\|^2} \quad (\text{III.3-u})$$

$g_{l,n,\zeta}$ est le gradient de la $(n-1)$ ème fonction coût F par rapport au paramètre ζ_l .

et

$$g_{l,n,\zeta} = -v_{n-1}^2 \zeta_{l,n-1} \mathbf{H}^\dagger (M_l - \mathbf{H} I_l^{\text{inc}} \zeta_{n-1}) + \zeta_{l,n-1} C \sum_{l=1}^L [\zeta_{l,n-1}^2 - I_0] \quad (\text{III.3-v})$$

Le calcul de d_n^γ est le même que celui donné dans III.3.2, à la différence que les I_l sont remplacés par leurs estimations $\zeta_{l,n-1}^2$ dans l'équation (III.3-k).

Discussion

Notre approche repose sur le fait que la somme des illuminations est connue, et égale à la fonction I_0 . Généralement, nous utilisons des motifs d'illuminations dont la moyenne est facile à estimer car elle est homogène : I_0 est alors une fonction constante. En pratique, cependant, il est probable que la moyenne réelle des illuminations soit différente de la fonction I_0 que nous avons choisie. Les conséquences d'une telle erreur méritent d'être discutées : quel résultat notre algorithme est-il susceptible de donner lorsque la moyenne des illuminations est différente de son estimation *a priori*, I_0 ? Pour tenter de répondre à cette question, reprenons le modèle utilisé :

$$M_l(x, y) = I_l(x, y) \times \rho(x, y) * \text{PSF}(x, y) \quad \text{pour } l = 1, \dots, L, \quad (\text{III.3-w})$$

et

$$\frac{1}{L} \sum_{l=1}^L I_l(x, y) = I_0(x, y). \quad (\text{III.3-x})$$

Si la moyenne réelle des illuminations, $\bar{I}(x, y)$ est différente de $I_0(x, y)$, alors l'équation (III.3-x) est fausse, et notre modèle erroné. En remarquant que l'équation (III.3-w) reste valable si l'on remplace à la fois ρ par $\rho' = \rho \times f$ et les I_l par $I'_l = I_l / f$, et en choisissant la fonction f adéquate, on peut toujours trouver des estimations I'_l et ρ' (fausses) qui vérifient les deux équations de notre modèle et vers lesquelles l'algorithme devrait donc converger :

si

$$f(x, y) = \frac{\bar{I}(x, y)}{I_0(x, y)}, \quad (\text{III.3-y})$$

alors
$$\frac{1}{L} \sum_{l=1}^L I_l' = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L (I_l(x, y)/f) = \frac{I_0(x, y)}{\bar{I}(x, y)} \times \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L I_l(x, y) = I_0(x, y). \quad (\text{III.3-z})$$

et
$$M_l(x, y) = I_l(x, y) \times \rho(x, y) * PSF(x, y) = I_l'(x, y) \times \rho'(x, y) * PSF(x, y). \quad (\text{III.3-aa})$$

Ainsi, en faisant une erreur sur l'estimation de $\bar{I}(x, y)$, on est donc susceptible d'obtenir une estimation de ρ égale à ρ' , c'est à dire modulée par le rapport entre $\bar{I}(x, y)$ et son estimation $I_0(x, y)$ (et l'inverse pour les I_l).

Pour démontrer l'efficacité de notre algorithme de reconstruction, nous avons effectué plusieurs expériences sur des données simulées puis expérimentales. Pour mettre en avant le rôle de l'éclairage structuré dans la super-résolution, nous avons systématiquement comparé les reconstructions avec la déconvolution d'une image large champ du même échantillon. Cette déconvolution a été faite avec les mêmes techniques de régularisation que notre algorithme. Ces résultats sont présentés dans la section qui suit.

III.4. Résultats expérimentaux de reconstruction en éclairage structuré

Nous avons observé des billes fluorescentes nanométriques (Fluorescent Particles, Sky Blue, $\varnothing 90\text{nm}$, Spherotech Inc.) déposée en solution sur une lamelle de verre, puis recouvertes après évaporation du solvant par de la glycérine, dont l'indice est proche du verre. Celle-ci permet de s'affranchir des problèmes qui peuvent se poser lors de l'inversion, lorsqu'un éclairage évanescent est utilisé [150] : notre modèle suppose en effet que l'objet et la fonction d'illumination sont bidimensionnels. La PSF utilisée pour l'inversion a été estimée à l'aide de billes isolées (*cf.* Figure III.2-1), et 24 images ont été enregistrées. Celles-ci correspondent à 3 orientations de la grille de lumière¹ ($\Delta\varphi = n\pi/3$ avec $n = \{0,1,2\}$), pour lesquelles 8 positions différentes ont été à chaque fois utilisées ($\Delta\varphi = m\pi/4$, avec $m = \{0,1, \dots, 7\}$).

En premier lieu, nous souhaitons vérifier que les fonctions d'illumination reconstruites par notre algorithme correspondent bien à celles qui sont attendues. Sur la Figure III.3.3-1, nous montrons l'une d'entre elle. Son apparence visuelle est assez éloignée de la fonction sinusoïdale attendue, mais cela s'explique simplement par le fait que la densité de fluorescence est faible ou nulle en dehors des billes, et donc sur la majorité du champ de vue. Or, la présence d'objet fluorescent est nécessaire pour « sonder » l'intensité lumineuse en chaque point de l'image. Là où il n'y en a pas, l'algorithme ne fait donc pas (ou peu) évoluer l'estimation de l'intensité, et celle-ci est maintenue à sa valeur initiale (*i.e.* une fonction constante de valeur unitaire). Toutefois, la composante périodique de la grille de lumière apparaît clairement sur la transformée de Fourier de l'illumination reconstruite, alors qu'elle était totalement invisible sur celle de l'image correspondante. Cette périodicité est l'élément clé dans la reconstruction d'une image super-résolue de la densité de fluorophores.

¹ *cf.* Figure III.1-5

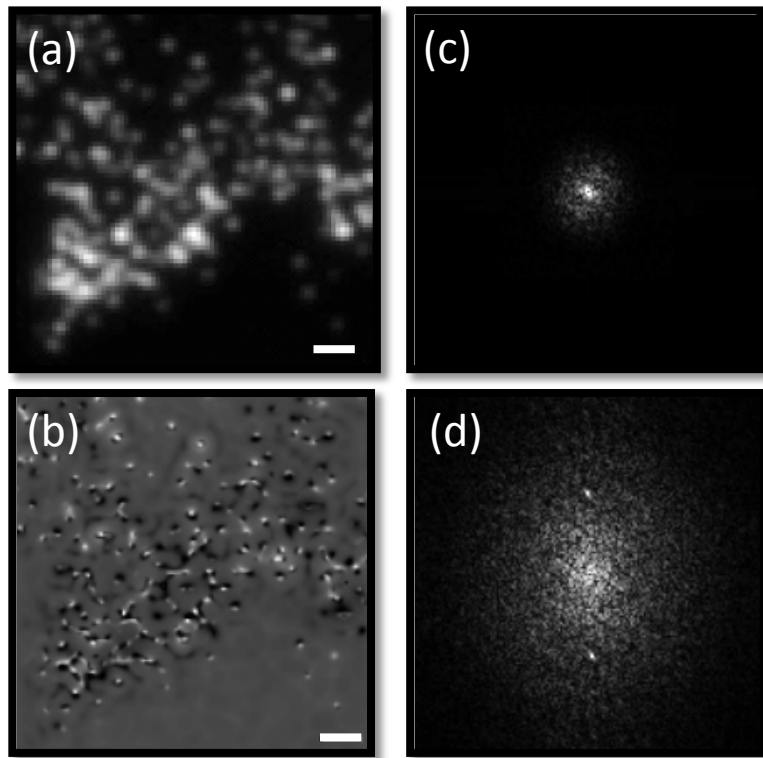


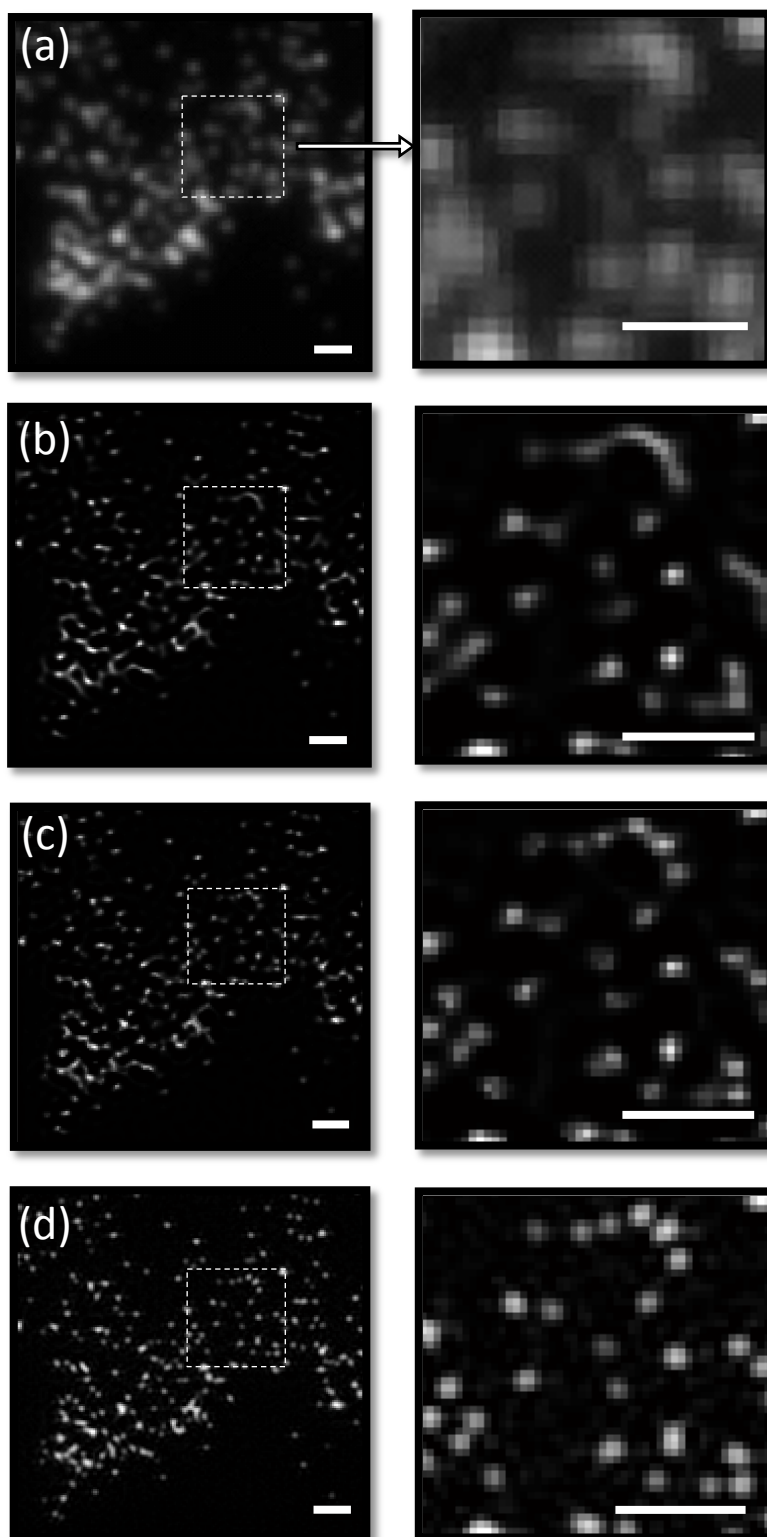
Figure III.3.3-1
Reconstruction d'un motif
d'illumination structuré par
notre algorithme d'inversion.

(a) Image en champ large non-traitée

(b) Reconstruction du motif d'illumination données par notre algorithme

(c) et (d) Transformées de Fourier de (a) et (b), respectivement.

La reconstruction de l'objet est présentée dans la Figure III.3.3-2, **(d)**, et nous la comparons à l'image obtenue en champ large classique **(a)**, la déconvolution de cette même image **(b)** et une reconstruction obtenue en utilisant un des meilleurs algorithmes d'inversion « classiques », aujourd'hui utilisé commercialement par Zeiss **(d)**. Ce dernier effectue une inversion analytique (cf. III.3.1) en partant d'une connaissance *a priori* de la période de la grille, de son orientation et de ses déplacements d'une image à l'autre. Les calculs ont été réalisés par le professeur Rainer Heintzmann (Université de Jena, Allemagne). Les résultats sont concluants : l'image que nous obtenons avec notre inversion présente une résolution significativement meilleure que celle de l'image déconvoluée, et tout à fait comparable avec celle que donne l'algorithme d'inversion classique.



(a) Image en champ large non-traitée

(b) Image en champ large déconvoluée avec un algorithme non linéaire

(c) Image obtenue par éclairage structuré, inversée avec l'algorithme non linéaire sans connaissance des motifs d'illumination a priori

(d) Image obtenue par éclairage structuré, inversée avec un algorithme linéaire, où les motifs d'illumination sont connus. L'inversion a été effectuée par Rainer Heintzmann sur nos données expérimentales.

Les images de droite sont un agrandissement de la zone délimitée par des pointillés sur celles de gauche.

Les barres d'échelle font toutes $1\mu\text{m}$.



Figure III.3.3-2

Éclairage structuré sur des billes fluorescentes de 90 nm de diamètre – comparaison de l'algorithme linéaire et non-linéaire.

III.5. Éclairage structuré par des speckles aléatoires

Grâce au bon fonctionnement de notre algorithme, capable de reconstruire simultanément la densité de fluorescence et les fonctions d'illumination si la moyenne de ces dernières est connue *a priori*, nous avons voulu étendre le concept de la super-résolution par éclairage structuré en fluorescence à un autre motif structuré, plus complexe qu'une simple grille d'interférence mais plus simple à obtenir expérimentalement : le speckle.

Le motif de speckle apparaît lorsqu'un faisceau cohérent est localement déphasé par une surface rugueuse ou de nombreux diffuseurs ponctuels (poussières...). Il correspond à l'interférence d'ondes planes de phases relatives et d'orientations aléatoires. Dans le cas d'un speckle « pleinement développé », les directions de propagation de ces ondes couvrent l'ensemble de l'angle solide qui est accessible avec une ouverture numérique donnée : les composantes transverses de leurs vecteurs d'ondes remplissent un disque de rayon $k_0 NA$ dans l'espace de Fourier. Par conséquent, le support de la transformée de Fourier 2D du motif en intensité correspondant s'étend jusqu'à $2k_0 NA$ (cf. Figure III.5-2, p 87). En éclairant un objet fluorescent avec un tel motif, nous pouvons finalement espérer récupérer des informations spectrales allant jusqu'à $4k_0 NA$, grâce au même effet de Moiré que nous utilisons en éclairage structuré « classique ». Ce principe a déjà été validé expérimentalement, pour l'imagerie d'objets fluorescents avec de faibles ouvertures numériques [151,152]. Cette technique nécessite cependant de connaître (avec une bonne résolution) la fonction d'illumination pour pouvoir « décoder » les images obtenues, ce qui limite son intérêt pratique par rapport à un éclairage structuré classique. Un seul motif d'illumination, déplacé par rapport à l'objet, est utilisé pour toutes les mesures. De manière similaire, la « ptychographie » utilisée en imagerie par rayons X permet de reconstruire l'image super-résolue d'un objet à partir de plusieurs mesures effectuées en « scannant » l'échantillon avec un éclairage inconnu mais supposé constant [153].

Avec notre approche, plusieurs éclairages sont utilisés et ceux-ci n'ont pas besoin d'être connus avant le processus d'inversion. Cela permet de simplifier largement l'aspect expérimental de la mesure, comme nous le verrons dans la section III.5.1. En revanche, leur

moyenne doit être une fonction connue *a priori*. Il se trouve que la moyenne d'un grand nombre de speckles décrits par la même statistique présente l'avantage de tendre vers une fonction constante [154] :

$$\text{si} \quad \bar{I}_L(x, y) = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L I_l(x, y) \quad (\text{III.5-a})$$

$$\text{avec} \quad \langle I_l(x, y) \rangle_{x,y} = 1, \quad (\text{III.5-b})$$

$$\text{alors} \quad \sigma_{\bar{I}_L} = \frac{1}{\sqrt{L}} \quad (\text{III.5-c})$$

$\langle I(x, y) \rangle_{x,y}$ désigne la valeur moyenne de $I_l(x, y)$ sur la surface d'étude et $\sigma_{\bar{I}_L}$ est l'écart-type de \bar{I}_L autour de sa valeur moyenne. La moyenne d'un grand nombre de speckles peut donc être estimée par une fonction $I_0 = \text{constante}$. L'équation (III.5-c) montre toutefois que cette estimation n'est jamais totalement valide : pour que \bar{I}_L soit parfaitement constante, un nombre infini d'illuminations différentes est requis. De manière empirique et arbitraire, nous considérons généralement que l'utilisation d'une centaine de speckles différents suffit pour que la modulation résiduelle¹ observée sur le résultat soit acceptable.

III.5.1. Montage expérimental

La simplicité du montage expérimental est l'intérêt principal de l'illumination structurée par speckle aléatoire. Celui-ci ne nécessite quasiment aucun réglage, et très peu de matériel. Un laser hélium-néon élargi est focalisé dans le plan focal arrière de l'objectif par une lentille « de tube », afin d'obtenir un faisceau collimaté du côté de l'échantillon. La formation du speckle se fait en insérant un diffuseur transparent (une simple pochette plastique granuleuse) sur le chemin du faisceau, en amont de cette lentille « de tube ». Pour que le speckle soit « pleinement développé », nous vérifions que l'ensemble de la pupille d'entrée de l'objectif est éclairée de manière homogène par le cône de lumière diffusée obtenu. Tant que cette condition est vérifiée, le placement du diffuseur par rapport à la lentille n'est pas critique. Pour limiter l'importance de la lumière diffusée en dehors de l'angle solide de

¹ cf. discussion de la section III.3.3

collection de la lentille, nous avons toutefois préféré le placer à seulement quelques centimètres de celle-ci.

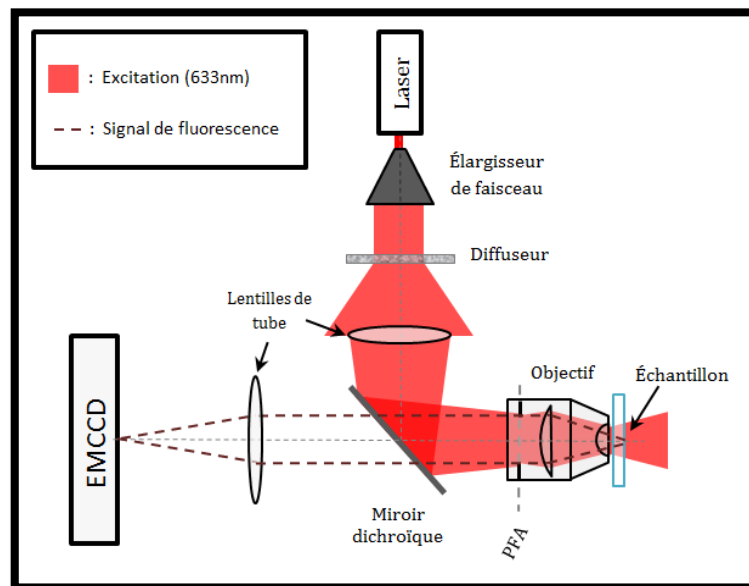


Figure III.5-1 : Montage expérimental pour l'illumination structurée par speckle aléatoire

Pour modifier la structure du speckle, il suffit de déplacer le diffuseur. Nous l'avons pour cela monté sur une platine de translation, activée par un moteur pas à pas. L'ensemble est piloté par un programme Labview, qui assure la synchronisation des translations et l'acquisition des images avec la caméra EMCCD. Notons que les motifs d'illumination ainsi obtenus ne sont pas tout à fait décorrélés : ils sont liés à la structure fixe du diffuseur et se déplacent en même temps que celui-ci. Pour y remédier, il est possible d'ajouter un second « étage » de diffusion en ajoutant par exemple un second diffuseur, fixe par rapport au premier.

Avant les acquisitions, nous avons vérifié que les motifs de speckle obtenus correspondaient à ce que nous souhaitions, et notamment qu'ils contenaient bien toutes les fréquences spatiales accessibles avec l'ouverture numérique de l'objectif utilisé. Pour cela, nous avons remplacé l'échantillon par un miroir et enlevé le filtre (non représenté sur le schéma) qui permet de supprimer totalement la petite partie du signal d'excitation qui est réfléchi au niveau de l'échantillon et transmise pas le dichroïque. L'image obtenue nous permet de connaître, d'un point de vue statistique, le type de motif qui éclairera l'échantillon fluorescent lors des mesures.

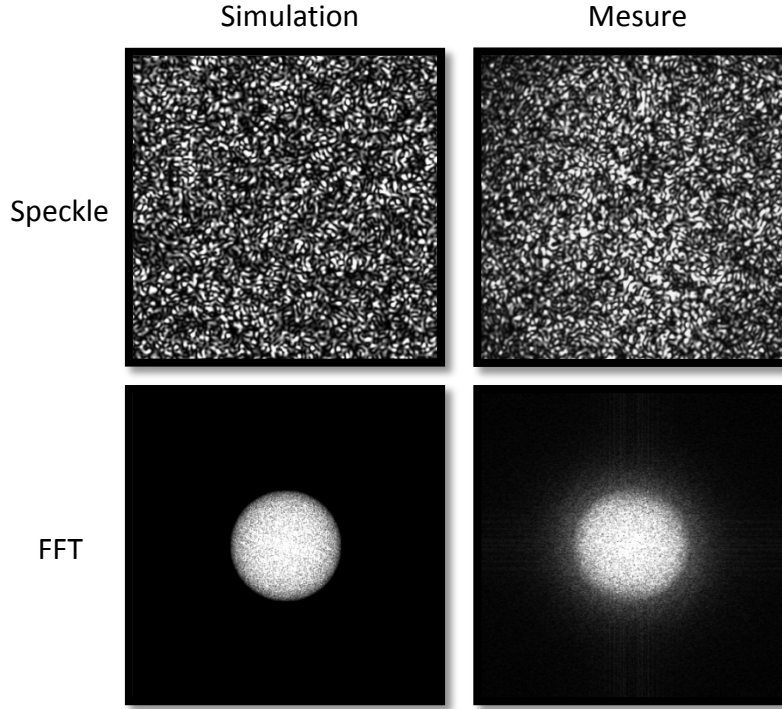


Figure III.5-2 :
Comparaison speckle
simulé et mesuré par
réflexion sur un miroir
placé dans le plan focal
objet.

La transformée de Fourier du motif montre que celui-ci contient des fréquences aléatoires réparties dans l'espace de Fourier sur un disque de rayon $2k_0NA$

III.5.2. Résultats simulés

Afin de vérifier la capacité de notre algorithme à tirer parti des hautes fréquences qui composent les motifs de speckle pour reconstruire une image super-résolue de la densité de fluorescence, nous avons donc d'abord travaillé sur des données simulées. Pour cela, nous utilisons l'équation (III.3-w) :

$$M_l(x, y) = I_l(x, y) \times \rho(x, y) * PSF(x, y) \quad \text{pour } l = 1, \dots, L, \quad (\text{III.5-d})$$

Les I_l correspondent aux distributions d'intensité dans le plan focal image formé avec des speckles aléatoires. Ceux-ci sont modélisés par la somme d'un grand nombre d'ondes planes d'amplitudes unitaires, dont les directions de propagation sont réparties de manière homogène dans l'angle de l'ouverture numérique, et dont les phases sont aléatoires. La longueur d'onde d'excitation choisie est de 633nm. Le résultat obtenu est très proche de la mesure expérimentale par réflexion (cf. Figure III.5-2). La PSF est simulée par une tâche d'Airy, dimensionnée à partir de l'ouverture numérique de l'objectif et la longueur d'onde de fluorescence (supposée égale à 650nm) :

$$PSF(\mathbf{r}) = \left(\frac{2J_1(k_0NA|\mathbf{r}|)}{k_0NA|\mathbf{r}|} \right)^2 \quad (\text{III.5-e})$$

L'objet est une mire que nous avons conçue pour donner une idée immédiate de la résolution obtenue dans toutes les directions. Elle est définie en coordonnées polaires¹ par :

$$\rho(r, \theta) = 1 + \cos(40 \theta), \quad (\text{III.5-f})$$

Enfin, ϵ_l correspond au bruit de mesure. Nous avons simulé un bruit de Poisson ainsi qu'un bruit blanc de lecture pour chaque pixel. Le bruit de Poisson est donné en chaque pixel par une variable aléatoire gaussienne, dont la variance est proportionnelle au nombre de photons détectés par le pixel en question. Nous avons considéré que sur une image, les pixels (dont la taille est égale à $\lambda/20$) convertissaient en moyenne 130 photons en électrons. Le bruit électronique de lecture moyen considéré est de 7 électrons par pixel et par image. Pour chaque résultat, 80 images illuminations différentes sont utilisées. Pour étudier l'influence des fréquences présentes dans le motif d'illumination sur la résolution finale, nous comparons les reconstructions obtenues lorsque le speckle (pleinement développé) est formé à travers une ouverture numérique plus faible, identique et supérieure à l'ouverture numérique en détection.

¹ L'origine du repère sur les images de la Figure III.5.2-1 correspond au coin supérieur gauche.

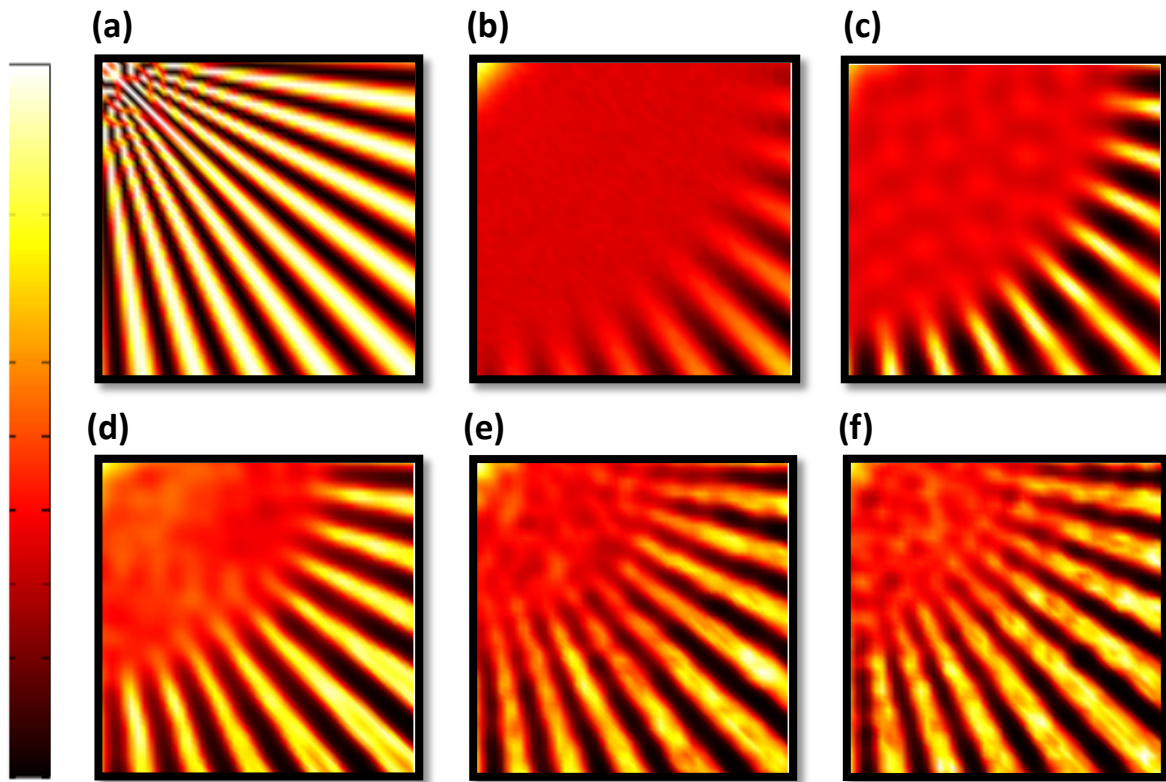


Figure III.5.2-1

Test de résolution par reconstruction d'une mire à partir de données simulée

(a) *Objet (ρ) ; (b) Image en champ large classique ; (c) Image en champ large déconvoluée (d), (e), (f) Estimations de ρ reconstruites à partir de 80 éclairagements par du speckle aléatoire formé avec une ouverture numérique de 0.5 NA, 1NA et 1.5 NA, respectivement, où NA est l'ouverture numérique en détection.*

On observe effectivement une amélioration significative par rapport à l'image en champ large classique, y compris après déconvolution. L'amélioration est d'autant plus grande que le speckle est formé à travers une ouverture numérique élevée, mais on observe une « saturation » de cet effet lorsque les fréquences spatiales de l'illumination se situent au-delà de la bande passante de détection. Ainsi, la résolution de (d) est bien inférieure à celle de l'image (e), obtenue avec des speckle de plus hautes fréquences spatiales, mais la différence entre les images (e) et (f) n'est pas clairement établie.

III.5.3. Résultats expérimentaux

Nous avons ensuite réalisé des mesures expérimentales pour montrer l'applicabilité de notre technique dans des conditions réalistes. L'échantillon observé est du jéjunum (tissu de l'intestin) de lapin, incorporés dans une résine et solidifié, puis découpé en tranches extrêmement fines (≈ 100 nm d'épaisseur) à l'aide d'un ultra-microtome. Ces échantillons ont été fournis, découpés et marqués en fluorescence par Cendrine Nicoletti, de l'Institut des Sciences Moléculaire de Marseille.

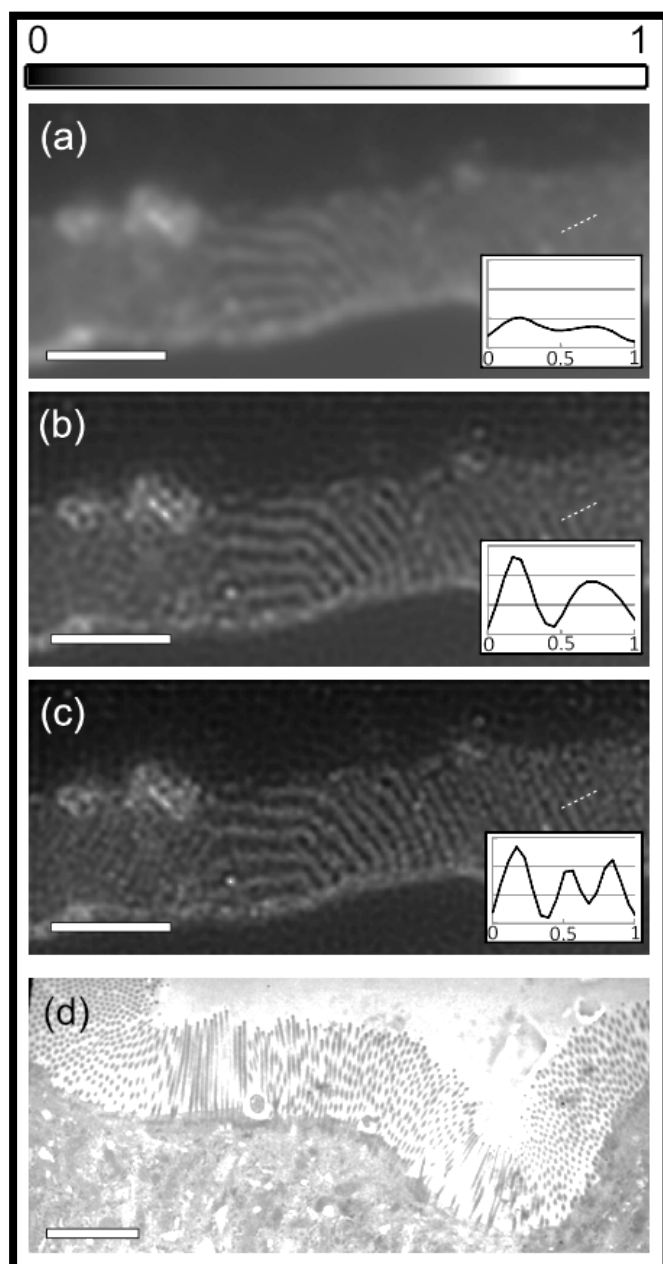


Figure III.5.3-1
Reconstruction super-résolue de microvillosités dans le jéjunum de lapin, en éclairage structuré par speckles aléatoires.

- (a) Image en champ large non-traitée
- (b) Déconvolution non-linéaire de l'image en champ large
- (c) Image super-résolue obtenue
- (d) Images d'une zone similaire obtenue avec un microscope électronique en transmission.

Les inserts correspondent aux profils d'une même zone, désignée par un segment en pointillés blancs sur les trois images.

Les barres d'échelle font $3\mu\text{m}$

La Figure III.5.3-1 permet de comparer une image en champ large obtenue avec une illumination homogène, cette même image déconvoluée par notre algorithme non-linéaire, et enfin l'image super-résolue obtenue à partir de 100 images de l'échantillon éclairé par des motifs de speckle aléatoires. L'amélioration de la résolution est bien visible, et mise en évidence par des courbes de profil. Ceux-ci sont mesurés en travers d'une zone où des microvillosités sont marquées, et deux d'entre elles ne sont résolues que sur la troisième image. Une image de zone comparable à celle imagée obtenue en microscopie électronique à transmission permet de s'assurer que les motifs observés correspondent effectivement à l'objet réel.

La grande originalité du travail réalisé dans ce chapitre réside dans l'algorithme d'inversion qui permet de reconstruire la densité de fluorescence de l'échantillon sans aucune information *a priori* sur les motifs d'éclairement utilisés. L'efficacité de la méthode de reconstruction a été démontrée sur des données expérimentales. Le contrôle de l'illumination n'étant plus nécessaire, cette approche devrait permettre de simplifier la mise en œuvre de la microscopie à éclairage structuré et d'étendre son domaine d'application de manière significative. Remarquons cependant que notre modélisation ne considère que des échantillons supposés infiniment fins et placés dans le plan focal objet de l'objectif. La fluorescence provenant des zones hors focus crée un fond inhomogène qui perturbe actuellement les reconstructions. Une des priorités sera donc d'étendre cette technique à une modélisation prenant en compte le caractère tridimensionnel de l'échantillon.

Le montage que nous avons présenté au début de ce chapitre peut servir à faire de l'imagerie en éclairage structuré standard, comme nous l'avons montré. Mais il est avant tout prévu pour être compatible avec l'utilisation de substrats nanostructurés, visant à améliorer d'avantage la résolution des images reconstruites. C'est l'objet du chapitre suivant.

Chapitre IV. Éclairage structuré assisté par réseau

Résumé du chapitre

Dans ce chapitre nous étudions une technique de microscopie de fluorescence à éclairage structuré, restreinte à l'imagerie de surface, mais présentant théoriquement une résolution bien meilleure que la limite de diffraction. L'idée principale consiste à remplacer les lamelles de verre sur lesquelles sont déposées les échantillons par des substrats périodiquement structurés [155,156], afin de créer des grilles de lumière dont la période est bien inférieure à $\lambda/2$. Il est alors possible d'améliorer de manière significative la limite de résolution latérale de l'éclairage structuré, sans utiliser un régime non-linéaire de fluorescence (comme proposé dans [91,92]).

Dans une première partie, nous détaillons la conception théorique de ces structures diélectriques. Celles-ci sont considérées comme la combinaison d'un guide d'onde plan et d'un réseau de couplage, formant un résonateur optique dont les modes propres peuvent être exploités pour former une grille de lumière évanescente comportant de très hautes fréquences spatiales, inaccessibles dans une configuration classique ($> 2k_0NA$).

Nous montrons ensuite les différentes étapes de la fabrication de ces composants nanostructurés qui ont été fabriqués au Laboratoire de Photonique et Nanostructures de Marcoussis.

Enfin, nous présentons la caractérisation expérimentale du comportement optique de ces réseaux. Pour cela, des mesures en champ proche optique ont été réalisées en collaboration avec le groupe d'optique de champ proche du Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne. Des observations en champ lointain (par fluorescence) ont également été menées. Celles-ci tirent parti d'une structuration basse fréquence de la grille de lumière, résultant d'un effet de Moiré entre un mode résonnant à haute fréquence latérale et un mode non résonant de fréquence un peu moins élevée.

Introduction

Dans les chapitre I et III, nous avons montré que l'éclairement structuré en fluorescence permettait d'obtenir des images en champ large, d'une résolution près de deux fois supérieure à celle d'une image obtenue avec un champ homogène. Cette technique est aujourd'hui relativement mature, et proposée dans des microscopes commerciaux (Nikon N-SIM et Zeiss ELYRA (P)S.1). Si l'on reste dans un régime linéaire de fluorescence, l'amélioration de la résolution est limitée par la période de la grille de lumière ou, plus généralement, par les fréquences qu'elle contient. La plus petite période que l'on peut obtenir est donnée par la figure d'interférence de deux faisceaux laser collimatés : elle vaut

$$p = \frac{\lambda_0}{2n\sin(\theta)},$$

où n désigne l'indice de réfraction du milieu dans lequel se propagent les deux faisceaux et θ l'angle formé entre leurs directions de propagation respectives et la normale au plan dans lequel on mesure la période. On comprend avec cette formule qu'il est intéressant d'augmenter l'angle d'incidence des faisceaux, mais également l'indice du substrat utilisé. Il est alors courant que ce dernier soit supérieur à l'indice du milieu dans lequel se trouve l'échantillon. Dans ce cas, à partir d'un angle d'incidence θ supérieur à l'angle critique $\theta_{crit} = \sin^{-1}(n'/n)$, on observe une réflexion totale interne du faisceau à la

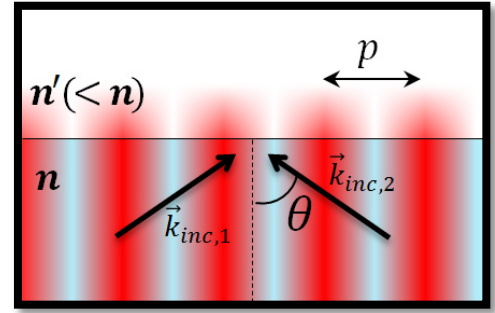


Figure 0-1
Configuration de réflexion totale interne pour l'éclairement

surface du substrat. La grille de lumière est alors confinée à une épaisseur de peau de quelques fractions de longueur d'onde, produisant un sectionnement en z de la zone observée : on parle de microscopie en réflexion totale interne (TIRFM) [50,51]. En éclairage structuré, cette configuration permet également d'atteindre une excellente résolution latérale [134-136,157]. Pour aller plus loin, un substrat fait d'un matériau d'indice optique plus élevé que les simples lamelles de verre ($n \approx 1.515$), tel que l'oxyde de titane (TiO_2 , $n \approx 2.49$) ou le diamant ($n \approx 2.41$), pourrait être utilisé. Étant donné les matériaux considérés, la fabrication de tels substrats serait difficile et onéreuse.

Certains matériaux diélectriques ou semi-conducteurs présentent des indices de réfraction supérieurs à 2.5 dans le visible, mais ils sont également absorbants. Leur indice de réfraction comporte une partie imaginaire (parfois notée k), qui se traduit par une décroissance exponentielle des ondes s'y propageant. Pour des coefficients de pertes assez faibles, la lumière peut tout de même traverser une faible épaisseur de matériau sans être trop atténuée¹. Dans ce cas l'utilisation d'un prisme (inévitavelmente trop « épais ») n'est pas possible, mais d'autres stratégies peuvent être envisagées [158]. L'une d'entre elles est de tirer profit de modes guidés pouvant se propager dans des couches fines d'un matériau d'indice élevé. Nous verrons que les modes guidés sont caractérisés par un nombre d'onde, noté α_{mode} , qui est nécessairement supérieur à $n_s k_0$ (où n_s est l'indice du substrat supportant la couche « guidante » d'indice élevé). En conséquence, ces modes ne peuvent pas être directement excités par une onde incidente propagative, et réseau coupleur doit être utilisé.

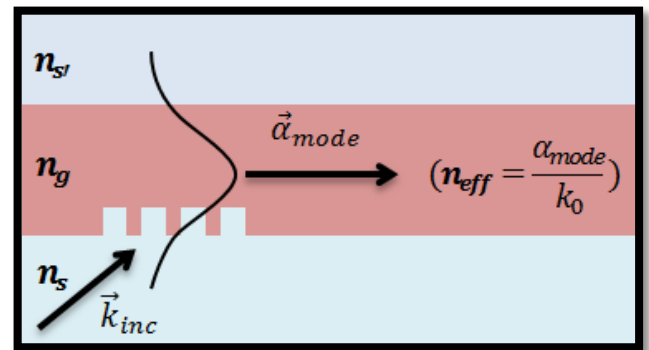


Figure 0-2
Mode guidé excité à l'aide d'un réseau

Généralement, les modes guidés sont utilisés avec des matériaux transparents (et donc d'indice optique inférieur à 2.4 dans le visible), pour qu'ils puissent s'y propager sur de longues distances. Avec de matériaux à pertes, l'excitation du mode guidé par le réseau de couplage est beaucoup moins efficace. Malgré cela, la résonance existe toujours, et elle pourrait être suffisante pour générer une grille de lumière à haute(s) fréquence(s). C'est ce que nous proposons dans ce chapitre. Notons que des plasmons de surface pourraient jouer un rôle similaire aux modes guidés dans un guide d'onde plan diélectrique. Formés niveau d'une interface métal/diélectrique, leur courbe de dispersion particulière permet dans certains cas d'obtenir des modes dont l'indice optique effectif est élevé [159,160], pouvant être utilisé pour confiner le champ électrique à des dimensions inférieures sub-diffraction [161-164]. Malheureusement, l'indice effectif est d'autant plus élevé que la couche

¹ Typiquement, l'amplitude est quasiment divisée par deux à la traversée d'une épaisseur de λ_0 d'un matériau dont les pertes sont de 10^{-1}

métallique est fine, ce qui pose des problèmes technologiques pour la fabrication de substrats « efficaces » pour faire de l'éclairage structuré basés sur les plasmons¹.

IV.1. Conception des réseaux résonnants

Nous allons à présent nous intéresser aux principales étapes de la conception théorique des substrats-résonnants que nous souhaitons utiliser. L'objectif est de définir une structure diélectrique nanostructurée qui permette d'obtenir une grille de lumière fortement contrastée et de la plus haute fréquence possible. De plus, cette grille doit pouvoir être translatée et tournée dans 3 directions, comme nous l'avons expliqué précédemment. Contrairement à ce que notre manière de l'exposer pourrait laisser croire, nous devons préciser que la conception des réseaux résonnants ne fut pas un processus linéaire en trois temps mais plutôt le résultat d'interactions avec le processus de fabrication et des contraintes technologiques que nous avons rencontrées.

IV.1.1. Guide d'onde plan diélectrique

Le guide d'onde plan diélectrique est l'élément clé de nos substrats nanostructurés, car il détermine en grande partie les caractéristiques des ondes évanescentes qui nous serviront à obtenir des motifs d'illumination à haute fréquence. La conception d'un réseau résonnant commence donc par celle d'un guide d'onde plan. Il est défini par une couche plane, appelée couche guidante, d'épaisseur e d'un matériau d'indice optique n_2 , comprise entre un substrat et un superstrat semi-infinis, d'indices respectifs n_1 et n_3 . Ceux-ci vérifient :

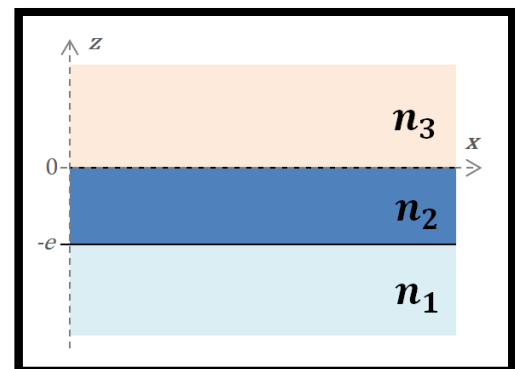


Figure IV.1.1-1 -
Structure du guide d'onde plan

$$n_2 > n_1 \text{ et } n_2 > n_3 . \quad (\text{IV.1-a})$$

¹ Un indice effectif d'environ 4 correspond par exemple à une couche d'argent épaisse de seulement 10nm, ce qui pose un problème technologique si l'on souhaite qu'elle reste homogène sur une surface raisonnable. par exemple des modes

Par la suite, nous utiliserons l'indice m pour généraliser l'écriture des équations dans les trois milieux :

$$m = \begin{cases} 1 & \text{si } z \leq -e \\ 2 & \text{si } -e < z < 0 \\ 3 & \text{si } z \geq 0 \end{cases} \quad (\text{IV.1-b})$$

Les trois milieux sont considérés homogènes, isotropes et non-magnétiques. L'invariance par rotation autour de l'axe z d'une telle géométrie permet de nous restreindre, sans perdre de généralité, à une étude bidimensionnelle dans le plan (xOz) . Nous choisissons enfin de restreindre notre étude¹ au cas transverse électrique, suffisant pour décrire les réseaux résonnants que nous avons utilisés pour faire de l'imagerie. Le champ électrique pourra donc être réduit à sa composante E_y que nous noterons simplement E .

Nous souhaitons caractériser les modes guidés du d'onde plan, qui correspondent à la propagation d'une onde électromagnétique monochromatique dans la direction (Ox) . Les équations de Maxwell en régime harmonique imposent au champ électrique créé par une telle onde de respecter l'équation de Helmholtz dans les trois milieux :

$$\Delta E_m(x, z) + (n_m k_0)^2 E_m(x, z) = 0, \quad (\text{IV.1-c})$$

ainsi que les conditions de passage aux interfaces : continuité de la composante transverse du champ électrique ($E_y = E$) et continuité de la composante normale du champ magnétique (H_z). Dans notre cas (TE), cette dernière condition se traduit, en appliquant les équation de Maxwell, par la continuité de $\partial E / \partial z$. En raison de l'invariance de la structure en x , la résolution de l'équation (IV.1-c) donne une forme générale du champ électrique suivante :

$$E_m(x, z) = F_m(z) e^{i\alpha_{mode} x}, \quad (\text{IV.1-d})$$

où $F(z)$ est une fonction complexe. En insérant l'équation (IV.1-d) dans l'équation (IV.1-c), on obtient les conditions suivantes sur $F(z)$:

$$\frac{\partial^2 F_m(z)}{\partial z^2} + (n_m k_0^2 - \alpha_{mode}^2) F_m(z) = 0. \quad (\text{IV.1-e})$$

¹ Le lecteur intéressé par d'autres cas est invité à se référer à [181].

Nous résolvons cette équation dans les 3 milieux qui constituent le guide d'onde. Dans chacun d'entre eux, la solution générale de l'équation (IV.1-c) est de la forme :

$$F_m(z) = A_m e^{-i\gamma_m z} + B_m e^{i\gamma_m z}. \quad (\text{IV.1-f})$$

A_m et B_m sont des constantes complexes. Les valeurs des γ_m sont déterminées par la longueur d'onde considérée (via k_0), les indices de réfraction n_m et la valeur de α_{mode} :

$$\gamma_m = \sqrt{(n_m k_0)^2 - \alpha_{mode}^2}. \quad (\text{IV.1-g})$$

Replacée dans l'équation (IV.1-d), cette solution générale correspond dans chaque milieu à la somme de deux ondes planes, l'une montante, l'autre descendante. Elles partagent toutes la même composante en x , α_{mode} , mais diffèrent par les valeurs que prennent les γ_m selon l'indice optique des milieux considérés. En particulier, lorsque $|\alpha_{mode}| > n_m k_0$, γ_m est un imaginaire pur et l'onde plane correspondante est évanescence en z . Un mode « guidé » correspond à un champ électrique qui tend vers 0 lorsque z tend vers $\pm\infty$: il est confiné à la couche « guidante ». Cette condition d'ondes sortantes entraîne que A_3 et B_1 sont nécessairement nuls. Il faut de plus que les ondes planes qui composent le champ dans le substrat et le superstrat soient évanescences, ce que l'on traduit par :

$$\alpha_{mode} > k_0 \times \max(n_1, n_3). \quad (\text{IV.1-h})$$

En revanche, nous ne considérons que les solutions pour lesquelles le champ est constitué d'ondes propagatives dans la couche guidante, ce qui mène à l'inégalité suivante :

$$\alpha_{mode} < k_0 n_2. \quad (\text{IV.1-i})$$

Au final, le champ est décrit dans les trois milieux par les équations suivantes :

$$E(z) = e^{i\alpha_{mode}x} \times \begin{cases} A_1 e^{+|\gamma_1|z} & \text{si } z \leq -e \\ (A_2 e^{-i\gamma_2 z} + B_2 e^{+i\gamma_2 z}) & \text{si } -e < z < 0, \\ B_3 e^{-|\gamma_3|z} & \text{si } z \geq 0 \end{cases} \quad (\text{IV.1-j})$$

Bien que nous ne l'ayons pas fait apparaître dans leur écriture, nous rappelons que les γ_m sont tous fonctions de α_{mode} . En appliquant les conditions de passage aux interfaces à ces trois expressions du champ, on obtient un système homogène d'équations qui permet de trouver les valeurs de A_1 , A_2 , B_2 et B_3 . Le calcul montre que ce système ne possède des solutions non-nulles qu'à la condition que α_{mode} vérifie l'équation transcendante suivante, appelée équation des modes :

$$e^{i2\gamma_2 e} = \frac{(\gamma_2 + \gamma_1)(\gamma_2 + \gamma_3)}{(\gamma_2 - \gamma_1)(\gamma_2 - \gamma_3)} \quad (\text{IV.1-k})$$

Remarquons que cette équation peut être physiquement interprétée comme une condition d'accord de phase similaire à celle utilisée pour calculer les modes propres d'une cavité de Fabry-Pérot par exemple. La description que nous avons donnée d'un mode guidé (Éq. (IV.1-j)) correspond en effet à la propagation d'une onde plane confinée dans la couche guidante par réflexions totales internes successives. En pratique, pour trouver les modes guidés d'un guide d'onde plan défini par (e, n_1, n_2, n_3) , nous cherchons numériquement les α_{mode} qui vérifient l'équation (IV.1-k), en limitant notre recherche à l'intervalle donné par les équations (IV.1-h) et (IV.1-i). Le substrat choisi est une lamelle de verre, tandis que le superstrat correspond au milieu dans lequel se trouvera l'échantillon, typiquement de l'air ou de l'eau.

Un mode guidé correspond à une solution non-nulle des équations de Maxwell, pouvant exister dans une structure en l'absence d'onde incidente, c'est-à-dire d'excitation. En ce sens, c'est un mode propre de l'oscillateur optique qu'est le guide d'onde plan. Comme tout oscillateur, lorsque celui-ci est excité avec une pulsation proche de la résonance, c'est-à-dire par une onde plane dont la composante en x du vecteur d'onde est proche de α_{mode} , on observe une exaltation de la réponse. Cette exaltation est limitée par les « frottements » du système, qui correspondent dans ce cas aux pertes par absorption dans la couche guidante. Nous souhaitons de plus que α_{mode} soit le plus grand possible pour pouvoir former une grille de lumière de fréquence élevée à l'aide du mode guidé, or sa valeur est limitée par l'indice optique de la couche guidante (cf. Eq. (IV.1-i)). Nous avons

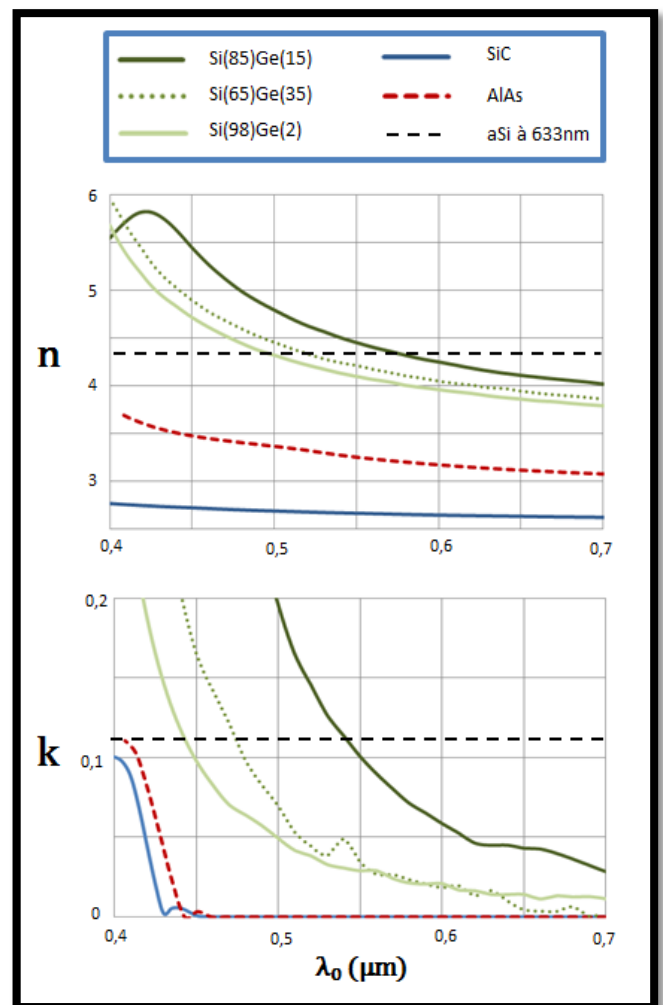


Figure IV.1.1-2
Indice de réfraction (n) et pertes (k) de différents matériaux dans le domaine du visible

donc cherché un matériau d'indice optique élevé et présentant un coefficient d'absorption relativement faible. Bien qu'il en existe plusieurs qui satisfont ces contraintes, (*cf.* figure ci-contre), notre choix s'est porté vers celui qui nous était le plus facilement accessible d'un point de vue technologique : le silicium amorphe (noté aSi). Une fois le matériau choisi, nous devons déterminer l'épaisseur de la couche guidante. On observe que les modes guidés des plus hautes fréquences n'apparaissent qu'à partir d'une épaisseur de couche relativement importante (autour de 150 nm), et ils sont rapidement absorbés. Un compromis doit donc être fait entre une résonance forte (*i.e.* une faible absorption) et l'utilisation de hautes fréquences : plus la partie réelle de l'indice effectif ($n_{eff} = \alpha_{mode}/k_0$) est proche de son maximum théorique (la partie réelle de n_{aSi}), plus sa partie imaginaire est grande également. A titre d'exemple, dans un guide d'onde plan composé d'une couche de aSi de 33nm d'épaisseur, déposée sur un substrat de verre exposée à l'air, le seul mode guidé observé a un indice effectif de $2.43+0.08i$. Une tel guide d'onde présente donc des pertes relativement faibles, une résonance marquée, mais son indice effectif reste éloigné du maximum théorique. Un des modes guidé observé dans une couche de 150 nm a un indice effectif de $3.84+0.10i$: son nombre d'onde est plus grand, mais il est plus rapidement absorbé.

IV.1.2. Réseau de couplage

Pour exciter le mode propre d'un guide d'onde plan défini par un nombre d'onde α_{mode} , nous devons utiliser une onde plane incidente dont le nombre d'onde $\alpha_{inc}(= |\vec{k}_{\parallel}|)$ (dans la direction de propagation du mode guidé) est proche de α_{mode} . L'équation (IV.1-h) montre que les ondes planes qui vérifient cette condition sont nécessairement évanescentes dans le substrat et le superstrat, et par conséquent impossibles à « injecter » depuis le champ lointain. La présence d'un réseau à la surface du guide d'onde est un moyen de résoudre ce problème. Nous avons choisi d'utiliser un

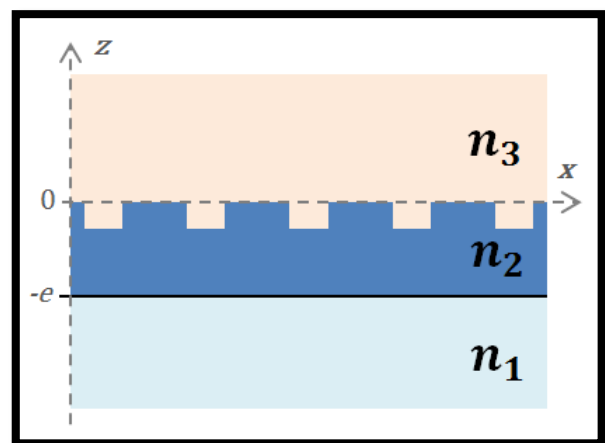


Figure IV.1.2-1
Réseau de couplage au guide d'onde plan

réseau 2D hexagonal, dont les propriétés de symétrie et d'invariance nous permettront de mieux couvrir l'espace de Fourier avec l'éclairement structuré.

D'une manière générale, le champ électrique généré à la surface d'un réseau 2D, lorsque celui-ci est éclairé par une onde plane monochromatique de vecteur d'onde \vec{k} et polarisée en mode TE (s), peut s'écrire sous la forme suivante [165] :

$$\vec{E}(\vec{k}, \vec{r}_{\parallel}, z \geq 0) = \sum_{(n,m) \in \mathbb{Z}^2} \vec{A}_{n,m} e^{i(\vec{K}_{n,m} + \vec{k}_{\parallel}) \cdot \vec{r}_{\parallel}} e^{i\gamma_{n,m}z}, \quad (\text{IV.1-l})$$

avec
$$\gamma_{n,m} = \sqrt{(k_0 n_3)^2 - |\vec{K}_{n,m} + \vec{k}_{\parallel}|^2}. \quad (\text{IV.1-m})$$

\vec{k}_{\parallel} est la projection de \vec{k} sur le plan ($z = 0$), et il est dirigé ici dirigé selon \vec{y} , \vec{r}_{\parallel} a pour coordonnées $(x, y, 0)$, k_0 est le nombre d'onde dans le vide pour la longueur d'onde utilisée et n_3 est l'indice de réfraction du milieu en $z > 0$. Les $\vec{K}_{n,m}$ sont les vecteurs de l'espace réciproque du réseau 2D. Dans le cas des réseaux hexagonaux que nous utilisons, ils s'écrivent :

$$\vec{K}_{n,m} = n\vec{u} + m\vec{v} \quad (\text{IV.1-n})$$

où
$$\vec{u} = (0, \frac{4\pi}{d\sqrt{3}}) \text{ et } \vec{v} = (\frac{2\pi}{d}, \frac{-2\pi}{d\sqrt{3}}), \quad (\text{IV.1-o})$$

Chacun des termes de l'équation (IV.1-l) correspond à une onde plane. Pour un réseau de dimensions sub-longueur d'onde, l'amplitude de l'onde transmise ($|A_{0,0}|$) est généralement bien plus grande que celle des ondes diffractées d'ordres supérieurs. Le motif d'intensité formé à la surface du réseau¹ est alors trop faiblement modulé pour que l'éclairement structuré donne de bons résultats. L'utilisation de plusieurs réseaux superposés pourrait résoudre ce problème [166], mais nous préférons tirer profit de la résonance d'un mode guidé pour exalter l'un des ordre supérieurs à (0,0). Cette solution s'avère notamment plus accessible d'un point de vue technologique.

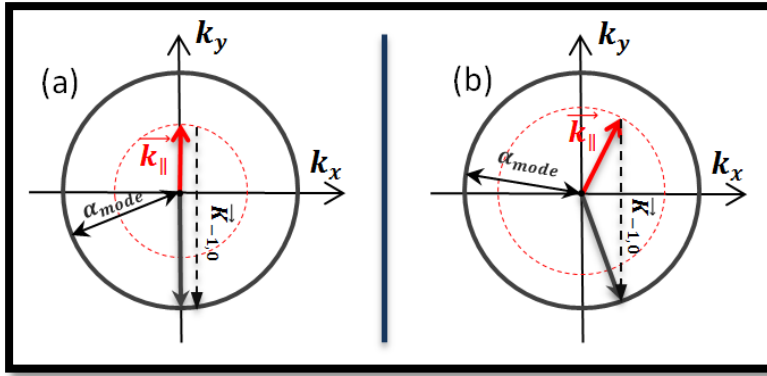
Pour exalter un ordre de diffraction par résonance, nous devons coupler celui-ci avec un mode guidé de la structure, proche de celui du guide d'onde plan homogène :

$$|\vec{K}_{n,m} + \vec{k}_{\parallel}| \approx \alpha_{mode} \quad (\text{IV.1-p})$$

¹ $I(\vec{k}_{inc}, \vec{r}_{\parallel}, z = 0) = |E(\vec{k}_{inc}, \vec{r}_{\parallel}, z = 0)|^2$

Nous avons choisi d'utiliser l'ordre $(-1,0)$ avec un éclairage dirigé selon \vec{y} pour deux raisons :

- D'abord, c'est le premier ordre de diffraction. Il est à ce titre généralement plus intense que les ordres supérieurs ; il pourra donc être exalté plus facilement par une résonance relativement faible attendue lorsque le coefficient d'absorption dans la couche guidante est de l'ordre de 10^{-1} .
- Ensuite, $|\vec{K}_{-1,0}|$ étant plus grand que α_{inc} , il permet d'exciter un mode guidé qui se propage dans le sens inverse (en (x,y)) de l'onde incidente. La fréquence de la grille de lumière créée par leur interférence est ainsi plus grande que s'ils se propageaient dans la même direction, comme ce serait le cas avec l'ordre $(+1,0)$ par exemple.



(a) Configuration retenue : $\vec{k}_{||}$ est dirigé selon \vec{y}
 (b) Exemple de configuration alternative : les angles azimutal et polaire de l'onde incidente ont été changés, et le mode guidé se propage dans une direction différente.

Figure IV.1.2-2

Diagrammes de correspondance entre le mode guidé et un ordre de diffraction du réseau

$\vec{k}_{||} (= (2\pi n_1/\lambda_0) * \sin(\theta_{inc}))$ est choisi pour que l'ordre transmis $(0,0)$ soit évanescant dans un superstrat d'indice optique inférieur à 1.33, ce qui permet de profiter des propriétés de sectionnement optique du phénomène de réflexion totale interne. Nous avons pris un angle d'incidence $\theta_{inc} = 65^\circ$, facile à obtenir avec un objectif à huile d'ouverture numérique 1.45 ou supérieure. Mathématiquement, cela signifie que $|\vec{k}_{inc||}| > k_0 n_3$, et donc que

$$\gamma_{n,m} \in i\mathbb{R}, \quad \forall (n,m) \in \mathbb{Z}^2. \quad (IV.1-q)$$

Les $\gamma_{n,m}$ sont ceux donnés par l'équation (IV.1-m). Notons que si toutes les ondes formées à la surface du réseau sont évanescentes, leur vitesse de décroissance exponentielle en z (i.e. $|\gamma_{n,m}|$) n'est pas la même: elle dépend de l'importance de la composante transverse de leur vecteur d'onde. Ainsi, l'ordre $(-1,0)$ décroît plus rapidement que l'ordre $(0,0)$, ce qui peut poser un problème lorsque l'échantillon observé est trop épais : la partie « haute » ne

subira plus l'influence du mode résonant et des hautes fréquences latérales que celui-ci apporte à la fonction d'illumination..

IV.1.3. Optimisation des réseaux résonnants

La présence d'une structure périodique sur une des interfaces d'un guide d'onde plan perturbe ses modes résonnants. La perturbation est d'autant plus grande que le réseau est profond et à fort contraste d'indice. De plus, pour obtenir une surface plane sur laquelle déposer l'échantillon, nous devons enterrer le réseau de couplage sous une fine couche de résine qui modifie légèrement le comportement des réseaux et doit donc être prise en compte dans leur design.

L'optimisation des réseaux consiste à trouver les dimensions – e, p, h, d et D – qui permettent d'exciter le plus efficacement possible un mode guidé de haute fréquence. Nous effectuons pour cela des simulations numériques à l'aide d'un code qui permet de connaître le comportement d'un empilement de couches dont la permittivité est connue et homogène ou périodique binaire¹. Initialement développé par Stefan Enoch à l'Institut Fresnel, il utilise la méthode modale de Fourier [167,168]. Celle-ci permet d'obtenir l'opérateur de diffraction (la matrice S) de la structure, qui relie le champ diffracté dans le substrat et dans le superstrat au champ incident. Concrètement, à partir des caractéristiques du réseau et de l'onde incidente, nous obtenons l'amplitude complexe des ordres de diffraction du réseau résonnant, soit la valeur complexe des $A_{n,m}$ dans l'équation (IV.1-1) que nous rappelons ici :

$$\vec{E}(\vec{k}, \vec{r}_{\parallel}, z \geq 0) = \sum_{(n,m) \in \mathbb{Z}^2} \vec{A}_{n,m} e^{i(\vec{K}_{n,m} + \vec{k}_{\parallel}) \cdot \vec{r}_{\parallel}} e^{i\gamma_{n,m}z}, \quad (\text{IV.1-r})$$

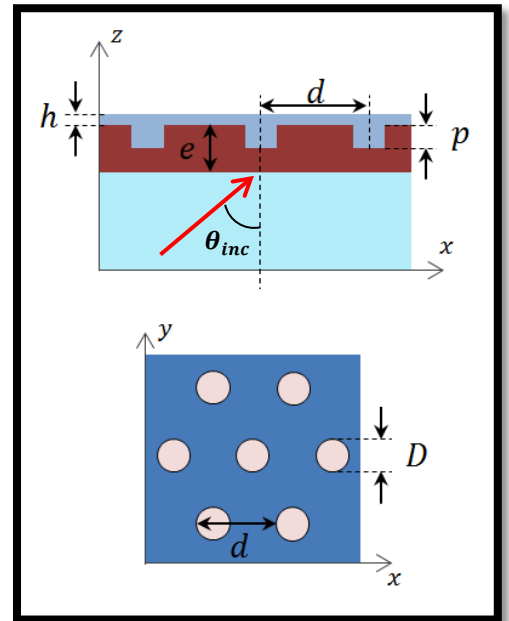


Figure IV.1.3-1
Caractéristiques géométriques des réseaux résonnants

¹ C'est à dire qui suit une structure périodique homogène par parties, constituée de deux matériaux différents et invariante en z .

L'objectif est de faire en sorte que les termes d'ordre (0,0) et surtout (-1,0) soient largement dominants sur les autres. Comme nous l'avons déjà évoqué, l'ordre (-1,0) décroît plus rapidement en z que l'ordre (0,0). Pour obtenir un contraste interférentiel satisfaisant sur une épaisseur de quelques dizaines de nanomètres, nous souhaitons donc que $A_{-1,0}$ soit légèrement supérieur à $A_{0,0}$. Pour ne pas procéder exclusivement par tâtonnements, nous pouvons nous intéresser à l'influence générale des principales caractéristiques de la structure. Un tel inventaire a été proposé par Tamir et Peng pour les réseaux coupleurs [169]. Globalement, un réseau profond et de fort contraste d'indice diffracte d'avantage la lumière et augmente l'amplitude de l'ensemble des ordres diffractés par rapport à l'ordre (0,0). C'est un avantage pour améliorer le couplage avec un mode guidé, mais l'influence des autres ordres peut devenir gênante pour faire de l'imagerie par éclairage structuré. Également, le facteur de remplissage du réseau - c'est-à-dire le volume des trous par rapport au volume du silicium amorphe – peut modifier les résonances de la structure. Ses modes propres se rapprochent en effet de ceux d'un guide d'onde plan dont l'indice de réfraction serait une moyenne pondérée des deux matériaux qui composent le réseau (dans notre cas, aSi et une résine d'indice 1.5).

Les courbes de la Figure IV.1.3-2 montrent l'évolution du ratio entre l'amplitude de l'onde transmise et celle de l'ordre (-1,0), ainsi que le rapport entre cette dernière et l'amplitude de l'onde incidente, en fonction de différents paramètres géométriques. Pour chaque courbe, nous ne faisons varier qu'un seul paramètre à la fois, autour des valeurs que nous avons choisies pour les réseaux dont nous présentons la caractérisation expérimentale à la fin de ce chapitre (cf. IV.4). Ces valeurs sont les suivantes :

Épaisseur du dépôt (e)	Profondeur des trous (p)	Diamètre des trous (D)	Période du réseau (d)	Épaisseur de la couche recouvrante de résine (h)
33nm	28nm	110nm	210nm	20nm

En observant les courbes, on constate que l'amplitude de l'ordre exalté (-1,0) ne varie pas brutalement avec le diamètre des trous ou leur distance centre à centre. De même, la résonance reste relativement présente lorsqu'on fait varier l'angle d'incidence du faisceau excitateur de quelques degrés autour de sa valeur optimale ($\sim 66^\circ$). En revanche, l'épaisseur totale de la couche de silicium amorphe est un paramètre un peu plus critique. Dans

l'ensemble, la résonance de nos réseaux se révèle plutôt « molle » et large, ce qui devrait permettre de s'accommoder des erreurs qui pourraient être commises lors de leur fabrication et de leur utilisation (excitation).

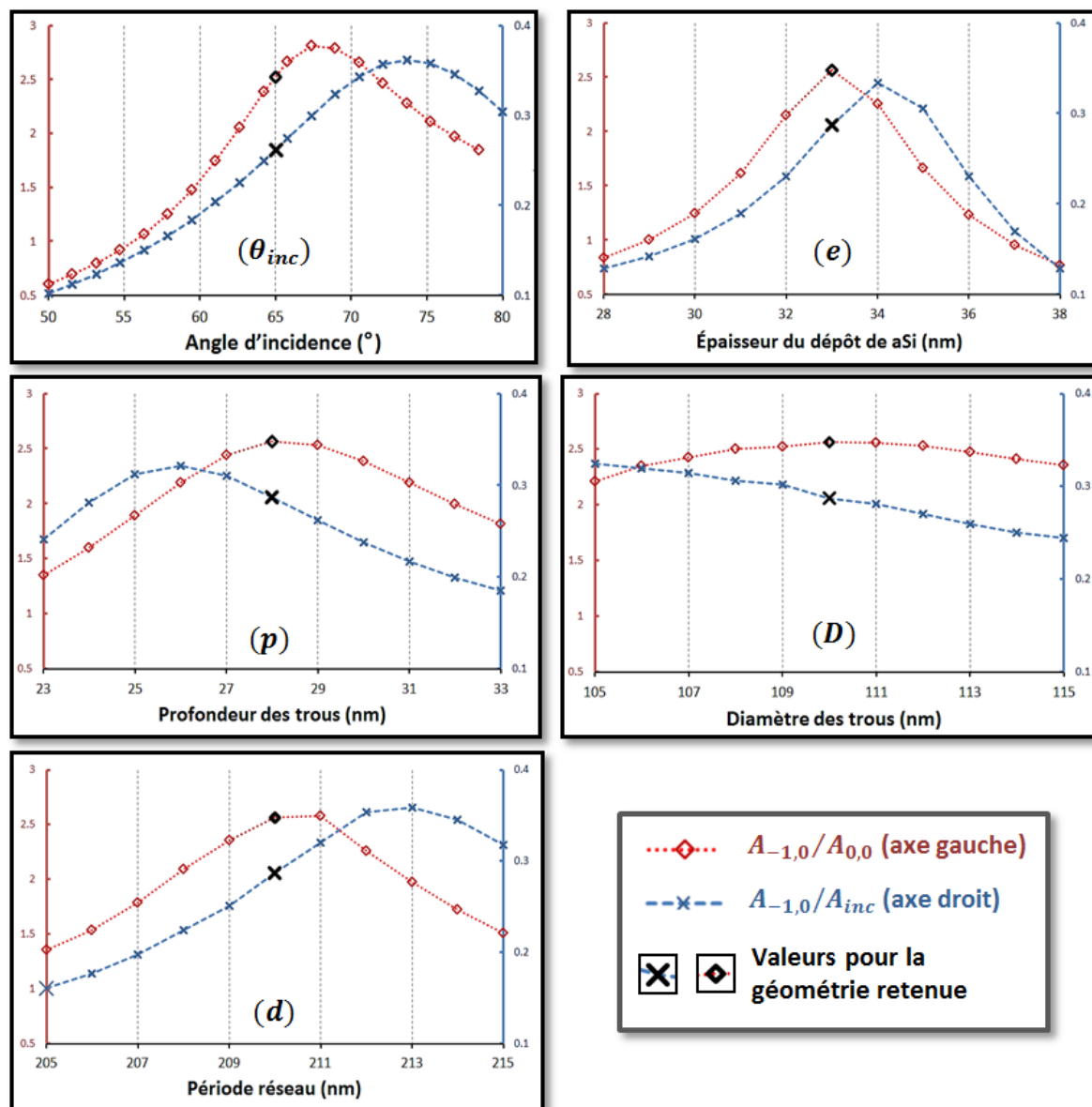


Figure IV.1.3-2

Influence de la variation de paramètres géométriques et de l'angle d'incidence sur l'efficacité d'excitation du mode guidé d'un réseau résonnant.

IV.2. Utilisation des réseaux résonnants pour l'imagerie

Pour pouvoir faire de l'éclairement structuré à la surface des réseaux que nous avons conçus, deux modes de fonctionnement différents sont prévus. Dans les deux cas, nous cherchons à obtenir en surface des réseaux une intensité lumineuse structurée par une (ou plusieurs) fréquence(s) la(les) plus grande(s) possible(s). La grille de lumière ainsi formée doit pouvoir être translatée pour éclairer la surface de l'échantillon de la manière la plus homogène possible (en moyenne). Cette translation doit également permettre, lors de l'inversion des données (*i.e.* de la reconstruction d'une image super-résolue), de distinguer les composantes spectrales de l'échantillon superposées dans les images mesurées, comme en éclairage structuré « classique ».

IV.2.1. Mode d'éclairement à une seule onde plane

L'intensité produite à la surface du réseau par une seule onde plane incidente est décrite par le module au carré du champ électrique donné par l'équation (IV.1-r). En supposant que les ordres (-1,0) et (0,0) dominent largement les autres, on obtient une modulation haute fréquence du motif d'illumination à la surface du réseau :

$$I_{\vec{k}_{inc}}(\vec{r}_{\parallel}, z) \approx \left| A_{0,0} e^{i(\vec{k}_{inc} \parallel) \cdot \vec{r}_{\parallel}} e^{i\gamma_{0,0}z} + A_{-1,0} e^{i(\vec{K}_{-1,0} + \vec{k}_{inc} \parallel) \cdot \vec{r}_{\parallel}} e^{i\gamma_{-1,0}z} \right|^2 \quad (IV.2-a)$$

$$\approx I_{0,0}^2(z) + I_{-1,0}^2(z) + 2I_{-1,0}(z)I_{0,0}(z)\cos(\vec{K}_{-1,0} \cdot \vec{r}_{\parallel} + \phi)$$

avec $\phi = \arg(A_{0,0}) - \arg(A_{-1,0}).$ (IV.2-b)

et $I_{n,m}(z) = |A_{n,m}| e^{-|\gamma_{n,m}|z}.$ (IV.2-c)

Lorsque $I_{0,0}(z)$ et $I_{-1,0}(z)$ sont égaux, la fonction d'illumination est parfaitement contrastée et similaire à celles obtenues en éclairage structuré standard (*cf.* Éq. III.1-a, p87).

Sa fréquence est toutefois plus élevée :

$$|\vec{K}_{-1,0}| = \frac{2\pi}{d} \frac{2}{\sqrt{3}} \approx 1.3 \times (2k_0 NA), \quad (\text{IV.2-d})$$

pour $d = 210\text{nm}$, période typique des réseaux que nous avons utilisés¹, et $NA=1.49$. Cette grille de lumière permet donc de couvrir des zones plus éloignées du spectre de l'objet ($\tilde{\rho}(k)$) qu'avec un éclairage structuré classique.

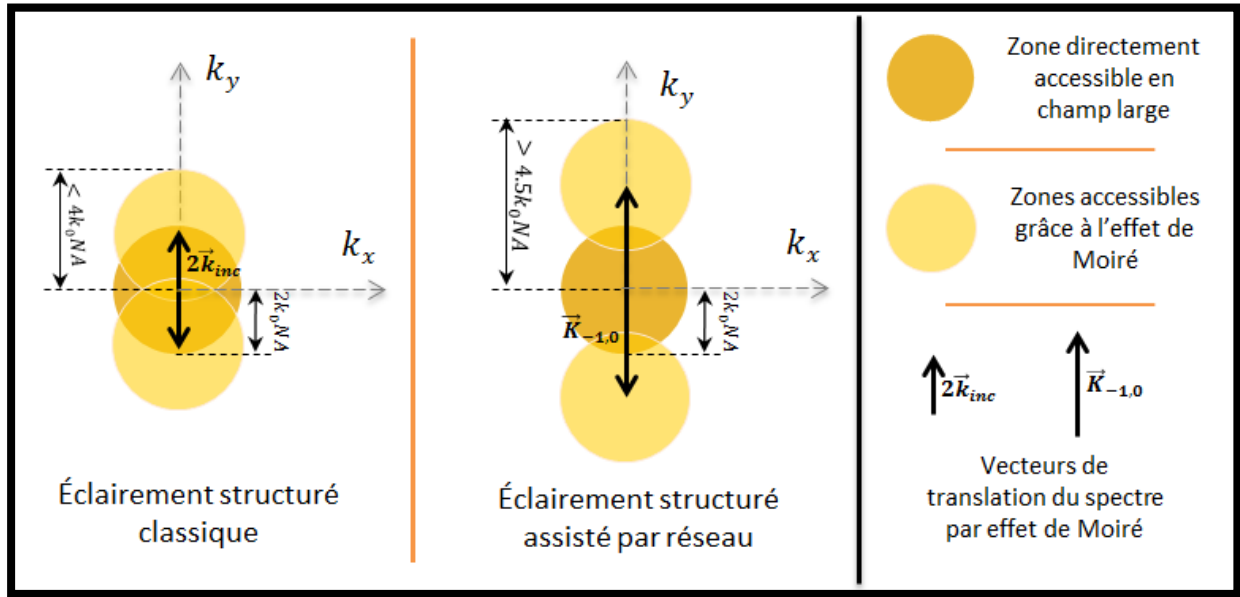


Figure IV.2.1-1

Comparaison du domaine de Fourier couvert par l'éclairage structuré standard et assisté par réseau (selon une seule direction)

Pour couvrir l'espace de Fourier de la manière la plus isotrope possible, la grille de lumière doit être tournée dans le plan (xOy) en profitant des 3 directions équivalentes de la structure hexagonale. La figure ci-dessous montre que cela permet une couverture quasi-isotrope de l'espace de Fourier. Enfin, pour modifier la position de la grille sans changer son orientation, nous profitons de l'invariance du réseau hexagonal par rotation(s) de π autour de l'axe z . Ainsi, si l'onde incidente subit la même rotation, un mode guidé se propageant dans la même direction mais dans le sens opposé peut être excité pour chacune des 3 directions équivalentes du réseau. Le motif obtenu est alors identique, à la différence du terme ϕ qui devient $-\phi$ dans l'équation (IV.2-a), ce qui traduit effectivement par une translation².

¹ Le gain passe de 1.3 (+30%) à 1.5 (+50%) pour des réseaux de période 170nm, mais la résonance du mode guidé est alors moins forte.

² Lors de la conception théorique du réseau, on veillera alors à ce que ϕ ait une valeur différente de $\pm\pi/2$.

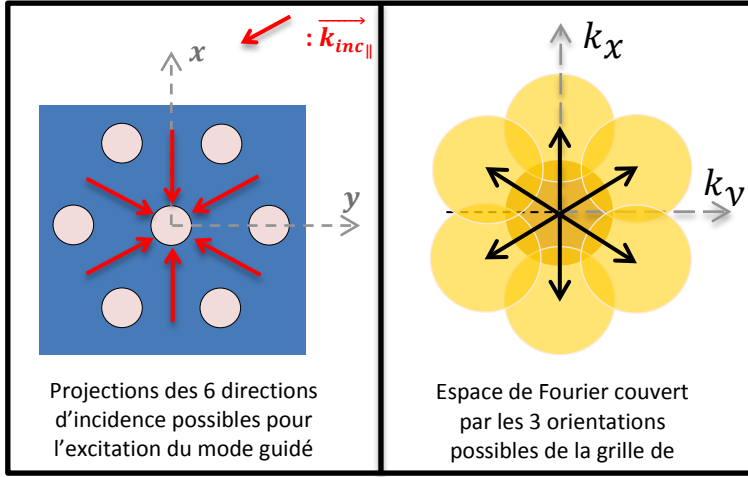


Figure IV.2.1-2
Directions d'excitation possibles par une onde plane et couverture de l'espace de Fourier

IV.2.2. Mode d'éclairement par deux ondes planes

Nous pouvons également exciter simultanément les réseaux résonnants avec deux ondes planes. Le dispositif expérimental est alors identique à celui utilisé en éclairage structuré standard que nous avons présenté dans le chapitre précédent¹, la seule différence étant que l'échantillon est cette fois déposé sur un réseau résonnant. Cette fois encore, chacune des deux ondes planes incidentes est diffractée principalement dans deux ordres, de telle manière que le champ total en $z=0$ peut s'écrire comme la somme de 4 ondes planes:

$$\vec{E}_{\vec{k}_{inc}}(\vec{r}_{\parallel}, z=0) \approx \vec{A}_{0,0} e^{i(\vec{k}_{inc}) \cdot \vec{r}_{\parallel}} + \vec{A}_{-1,0} e^{i(\vec{K}_{-1,0} + \vec{k}_{inc}) \cdot \vec{r}_{\parallel}} + \vec{A}_{0,0} e^{-i(\vec{k}_{inc}) \cdot \vec{r}_{\parallel} + i\varphi} + \vec{A}_{-1,0} e^{-i(\vec{K}_{-1,0} + \vec{k}_{inc}) \cdot \vec{r}_{\parallel} + i\varphi}. \quad (\text{IV.2-e})$$

Lorsque φ est le déphasage d'une onde incidente par rapport à l'autre et \vec{k}_{inc} représente le vecteur d'onde de la première. Le calcul du carré du module de ce champ électrique donne la répartition d'intensité suivante :

$$\begin{aligned} I_{\vec{k}_{inc}}(\vec{r}_{\parallel}, z \geq 0) \approx & 4[I_{0,0}^2(z) + I_{-1,0}^2(z)] \\ & + 4I_{0,0}(z)I_{-1,0}(z) \cos(\vec{K}_{-1,0} \cdot \vec{r}_{\parallel}) \cos(\phi) \\ & + 2I_{0,0}^2(z) \cos(2\vec{k}_{inc} \cdot \vec{r}_{\parallel} - \varphi) \\ & + 2I_{-1,0}^2(z) \cos(2[\vec{K}_{-1,0} + \vec{k}_{inc}] \cdot \vec{r}_{\parallel} - \varphi) \\ & + 4I_{0,0}(z)I_{-1,0}(z) \cos([\vec{K}_{-1,0} + 2\vec{k}_{inc}] \cdot \vec{r}_{\parallel} - \varphi) \cos(\phi). \end{aligned} \quad (\text{IV.2-f})$$

¹ cf. section III.1, p84

$\vec{k}_{inc \parallel}$ correspond à la projection de \vec{k}_{inc} sur le plan $z=0$. φ et les $I_{n,m}(z)$ sont respectivement donnés par les équations (IV.2-b) et (IV.2-c). Le motif d'illumination est donc une somme de quatre cosinus, dont les périodes sont données par les termes en gras dans l'équation ci-dessus¹, et dont les décroissances en z varient selon les ordres de diffraction qui contribuent à leur formation. Les cosinus des trois derniers termes peuvent être traduits en modifiant la phase relative φ des deux ondes incidentes, ce qui permet d'obtenir les différentes images nécessaires à la reconstruction d'une image super-résolue. Chacun de ces termes permet de traduire une zone différente de l'espace de Fourier à l'intérieur de la fonction de transfert optique du microscope. Enfin, la géométrie hexagonale permet cette fois encore d'orienter la grille de lumière dans trois directions équivalentes, pour obtenir une résolution 2D finale quasi-isotrope.

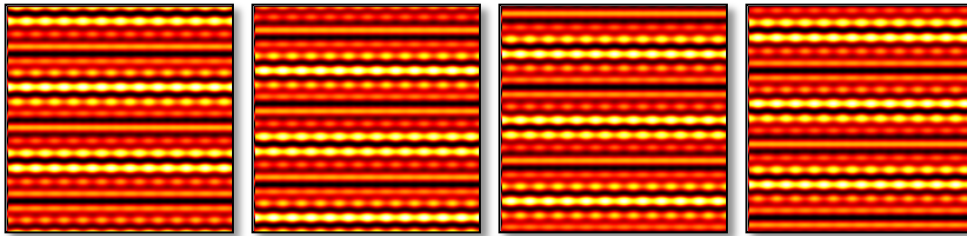


Figure IV.2.2-1

Simulations de l'intensité formée en surface des réseaux éclairés par deux faisceaux – le motif est modifié en incrémentant le déphasage relatif φ de $\pi/2$

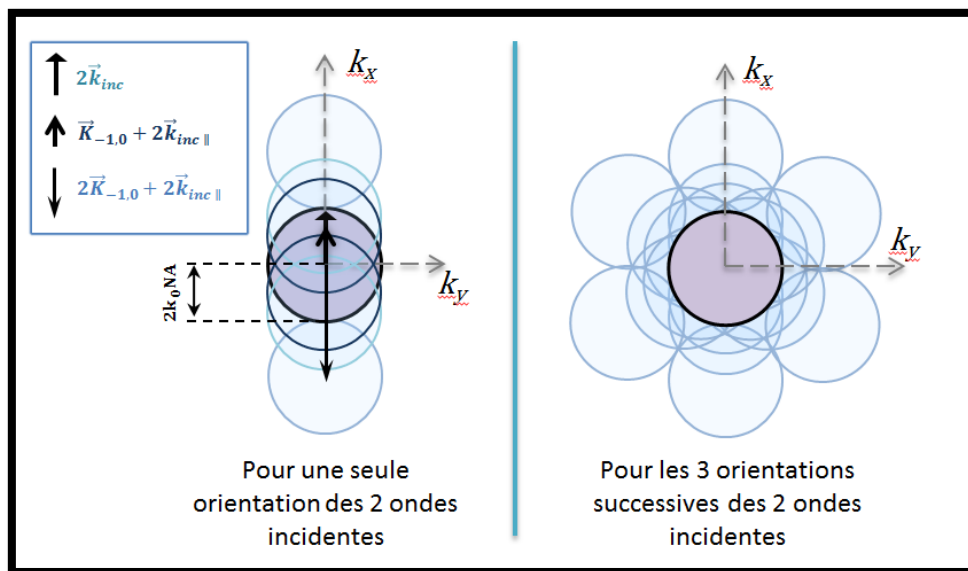


Figure IV.2.2-2

Couverture de l'espace de Fourier pour l'excitation à 2 ondes

¹ Nous rappelons que les vecteurs $\vec{K}_{-1,0}$ et $\vec{k}_{inc \parallel}$ sont de sens opposés.

IV.3. Fabrication des réseaux résonnants sur lamelle de verre

Les réseaux résonnants que nous avons utilisés ont été réalisés au Laboratoire de Photonique et Nanostructures (LPN) à Marcoussis. Nous détaillerons ici leur fabrication, en insistant sur les étapes technologiques clés du procédé permettant d'obtenir des réseaux correspondant le mieux possible à nos simulations numériques.

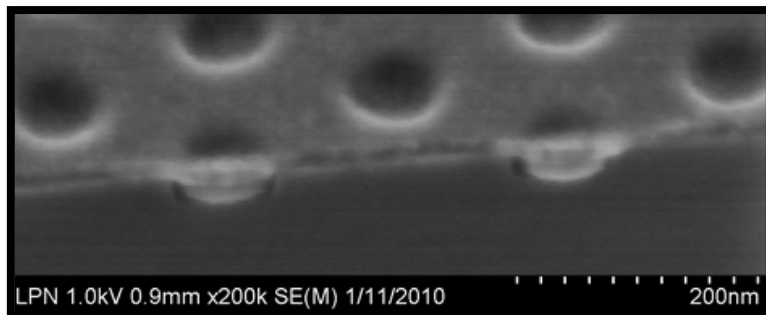


Figure IV.2.2-1

Image MEB de réseaux résonnants fabriqués sur substrat de silicium puis clivés pour permettre une observation de profil.

Pendant mon séjour au LPN, sous la supervision de Anne Talneau, j'ai contribué à la majorité des étapes de cette fabrication, ce qui m'a permis de comprendre les limites qui peuvent se poser sur des échantillons fabriqués, essentiellement en terme de précision, par rapport à leurs modèles théoriques idéaux conçus à l'aide de simulations.

IV.3.1. Dépôt de la couche diélectrique de silicium amorphe

La première étape de la fabrication est le dépôt du silicium amorphe sur la lamelle de verre. Celle-ci doit préalablement être nettoyée. Pour cela, un bain de quelques secondes (?) dans un mélange « piranha » (typiquement 3/4 de H_2SO_4 concentré + 1/4 H_2O_2 à 30 %) suivi d'un rinçage abondant à l'eau distillée est généralement très efficace.

Le dépôt du Silicium amorphe¹, se fait par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma radiofréquence². La lamelle nettoyée est placée à plat sur une électrode, dans la chambre du bâti (Unaxis D200). Une atmosphère de composition et de pression contrôlées est mise en place dans l'enceinte, en équilibrant le pompage à vide avec le flux de gaz précurseurs, dans notre cas de l'Helium et du Silane (SiH_4) relâchés dans l'enceinte. L'application d'une tension alternative (13,56 MHz) entre l'électrode sur laquelle est placé l'échantillon et une autre électrode placée au-dessus crée un plasma. Celui-ci est défini par l'ionisation d'une partie des molécules des gaz précurseurs, qui peuvent réagir chimiquement avec la surface exposée de l'échantillon et ainsi s'y déposer. La structure et la composition de la couche déposée dépendent de différents paramètres :

- La puissance totale du plasma, qui dépend de la tension appliquée entre les électrodes (*bias voltage*), et de leur surface.
- La pression et la température dans l'enceinte au cours du dépôt
- La nature et le débit des gaz précurseurs utilisés.

Les premiers dépôts que nous avons effectués présentaient une forte rugosité de surface, liée à la formation de poudres dans le plasma [170]. Pour sortir de ce régime, nous avons réduit les flux de gaz et la pression dans l'enceinte, en suivant les conclusions des études menées par le groupe de Pere Roca i Cabarrocas (Laboratoire PICM, Ecole Polytechnique).

Les conditions de dépôt qui nous ont permis d'obtenir un dépôt homogène et de faible rugosité sont les suivantes :

Puissance	<i>Bias Voltage</i>	Température	Pression	Débit SiH_4	Débit He
60 W	56 V	280°C	200 mTorr	12 sccm	100 sccm

Après le dépôt, la couche est caractérisée par une mesure d'ellipsométrie spectroscopique, ce qui permet d'obtenir son épaisseur et son indice optique à 633nm. La vitesse de dépôt est constante une fois le plasma allumé, ce qui permet d'ajuster la durée d'activation du plasma pour obtenir l'épaisseur de dépôt souhaitée. Cette vitesse a été calculée en mesurant l'épaisseur obtenue sur un échantillon test après un dépôt de durée déterminée. Typiquement, cette vitesse est d'environ 7,7 nm/min.

¹ Noté a-Si:H en raison de la présence d'hydrogène, ou simplement aSi.

² Plus communément appelé RF-PECVD - RF, pour *RadioFrequency - Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition* en anglais.

A ce stade, il est probable que l'épaisseur et l'indice optique du dépôt diffèrent ce que nous avons prévu. Une mesure par ellipsométrie nous permet de les connaître avec précision, et nous ajustons en conséquence les caractéristiques géométriques du réseau (période, diamètre et profondeur des trous) afin d'optimiser son comportement dans les simulations, avec les caractéristiques effectives de la couche de silicium amorphe.

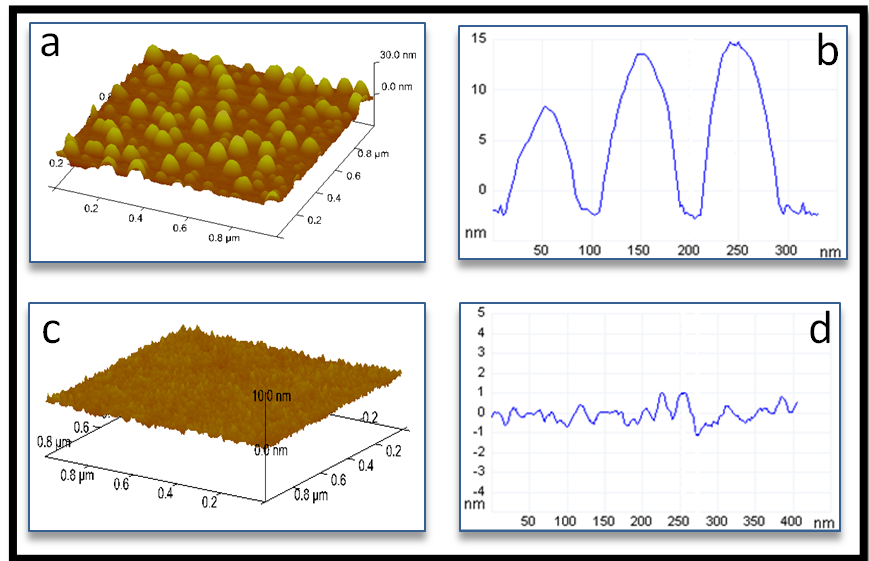


Figure IV.3.1-1
 Topographie et profil en coupe de la surface de aSi pour différentes conditions de dépôt.
 (a) et (b) : conditions initiales avec régime de poudre. (c) et (d) : procédé final

IV.3.2. Gravure du réseau

La gravure du réseau se fait en deux temps : le motif souhaité est d'abord inscrit dans un masque de résine par lithographie électronique, puis ce motif est transféré dans la couche de silicium amorphe par gravure ionique réactive.

Lithographie électronique

L'étape de lithographie électronique est réalisée par Anne Talneau. Une couche de résine PMMA de 250nm d'épaisseur est préalablement déposée sur la couche de silicium amorphe, par enduction centrifuge¹, suivie d'une couche de 15nm d'aluminium, déposée par évaporation. Cette dernière permet l'évacuation des charges électriques apportées par le faisceau d'électrons lors de l'insolation, la lame de verre étant non-conductrice. Après insolation, cette couche est retirée avec une solution diluée de soude, puis la résine est

¹ spin-coating en anglais

développée dans un bain d'une minute dans un mélange de méthylisobutylcétone (MIBK) + isopropanol (proportions respectives 1:3). La résine utilisée étant positive, seules les zones insolées correspondant aux trous du réseau sont ainsi dissoutes.

Nous avons utilisé la lithographie électronique en raison de ses capacités de haute résolution, nécessaires pour obtenir nos réseaux de périodes inférieures à 200nm. Cette technique est lente et onéreuse : l'insolation dure par exemple 1h30 pour obtenir un échantillon avec 9 réseaux de 100x100 μm chacun. Elle offre cependant l'avantage de la versatilité tant que les paramètres géométriques ne sont pas figés. Une fois qu'ils le seront, la technique de nano-impression (*nano-imprint*) pourrait être utilisée à la place. Celle-ci consiste à imprimer le motif souhaité dans une résine à l'aide d'un tampon rigide [171]. L'ensemble du motif est imprimé en une seule fois, ce qui permet de le reproduire plus rapidement et à plus faible coût sur plusieurs échantillon.

Gravure ionique réactive

La gravure ionique réactive permet de transférer dans la couche de silicium amorphe le motif présent dans la résine. Le bâti de gravure *CCP-RIE*¹ (Nextral NE100) fonctionne de manière très similaire à celui du dépôt RF-PECVD : l'échantillon est posé à plat sur une électrode puis enfermé dans une enceinte mise sous vide et dans laquelle des gaz réactifs sont injectés. Un plasma est créé de manière capacitive, en appliquant une tension alternative haute fréquence entre les électrodes. Les molécules des gaz réactifs sont ionisées et projetées à la surface de l'échantillon. La gravure résulte de procédés physico-chimiques de surface complexes [172]. La composante « physique » est liée à un simple effet mécanique : la surface de l'échantillon est gravée par pulvérisation, à cause du bombardement ionique. Elle dépend principalement de la puissance du plasma (*i.e.* du *bias voltage*, la tension appliquée entre les électrodes). Simultanément, les radicaux ioniques créés dans le plasma peuvent être chimisorbés pour former des composés volatils avec les atomes de surface, qui seront finalement désorbés. En général, une gravure fortement physique sera bien verticale, mais également peu sélective et susceptible de dégrader la surface gravée, tandis qu'une gravure chimique sera plus isotrope et sélective par rapport au masque utilisé. Notons que dans le cas de la gravure *RIE-CCP*, ces deux aspects ne sont pas

¹ Capacitively Coupled Plasma Reactive Ion Etching

Calibration

Pour obtenir des trous dont le diamètre et la profondeur sont conformes aux simulations, il est nécessaire de calibrer la dose électronique envoyée sur la résine lors de la lithographie électronique, ainsi que la durée de la gravure RIE. La première modifie le diamètre des trous dans le masque de résine, et par conséquent celui des trous dans le silicium amorphe. La seconde change leur profondeur. La dose adéquate est déterminée sur un échantillon de calibration où plusieurs doses différentes sont testées en même temps. Le diamètre des trous est mesuré après gravure RIE (pour prendre en compte une éventuelle gravure latérale), avec un microscope électronique à balayage. De même, nous testons plusieurs durée de gravure RIE sur des échantillons de test et mesurons les profondeurs de trous obtenues avec un microscope à force atomique. La durée de gravure qui correspond à la profondeur souhaitée en est déduite par interpolation linéaire.

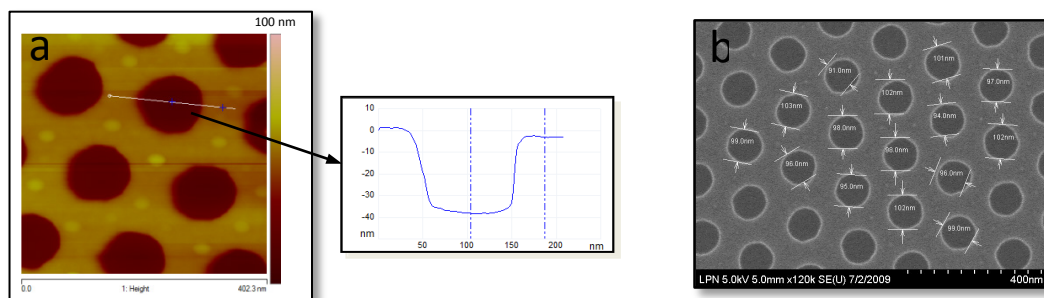


Figure IV.3.2-2

Calibration de la profondeur de gravure avec mesure AFM (a) et calibration du diamètre des trous avec mesure SEM (b).

IV.3.3. Planarisation

Nos réseaux résonnants sont conçus pour faire de l'imagerie de surface, sur un plan. Par conséquent, nous devons enterrer le réseau de trous obtenu après l'étape de gravure, pour obtenir une surface plane. Un nouveau dépôt de diélectrique, telle que de la silice, n'est pas une solution satisfaisante pour cela : lors du dépôt par PECVD d'une nouvelle couche, le réseau de trous est dégradé par le bombardement ionique du plasma. De plus, la nouvelle couche suit grossièrement la topographie du réseau sur laquelle elle est déposée. L'effet d'ondulation s'estompe avec l'épaisseur du dépôt, mais cela nécessite de déposer plus d'une centaine de nanomètres pour obtenir une surface à peu près plane, et nous souhaitons

obtenir une couche de moins de 30nm d'épaisseur. En effet, l'onde correspondant au mode résonnant du réseau est évanescence dans la résine ($\alpha_{\text{mode}}/k_0 > n_{\text{SiO}_2}$). Elle serait donc trop fortement atténuée à la surface d'une couche plus épaisse, et l'échantillon serait éclairé par le champ latéralement homogène créé par la seule onde incidente (*i.e.* l'ordre 0 de diffraction).

Après plusieurs essais de résines, nous avons opté pour une résine ultra-fluide (« AMONIL », AMO GmbH), initialement développée pour les procédés de nano-impression assistée par ultraviolets (*UV-NIL*), déposée par *spin-coating*. Destinée à épouser parfaitement la forme de tampons aux motifs nanométriques, elle permet de remplir de manière homogène le réseau de trous. Une fois réticulée par insolation UV, elle est parfaitement rigide, très faiblement absorbante ($k \approx 0,02$) et son indice optique (mesuré par ellipsométrie) est proche de celui du verre ($n \approx 1,5$). En collaboration avec Vincent Rouger et Sébastien Mailfert du Centre d'immunologie de Marseille Luminy, nous avons testé sa compatibilité avec des cellules vivantes (cellules fibroblastes COS-7, issues de reins de singe). Celles-ci ont été cultivées sur des lamelles recouvertes d'Amonil réticulée, nettoyées et stérilisées à l'éthanol et par irradiation UV. Trois heures après l'ensemencement, les cellules ont montré une bonne accroche à la surface de la résine. Après vingt-quatre heures, celles-ci avaient proliféré de manière identique à ce que l'on peut observer dans des flasques de culture ou des boîtes de pétri après la même durée, démontrant la parfaite biocompatibilité de l'Amonil réticulé.

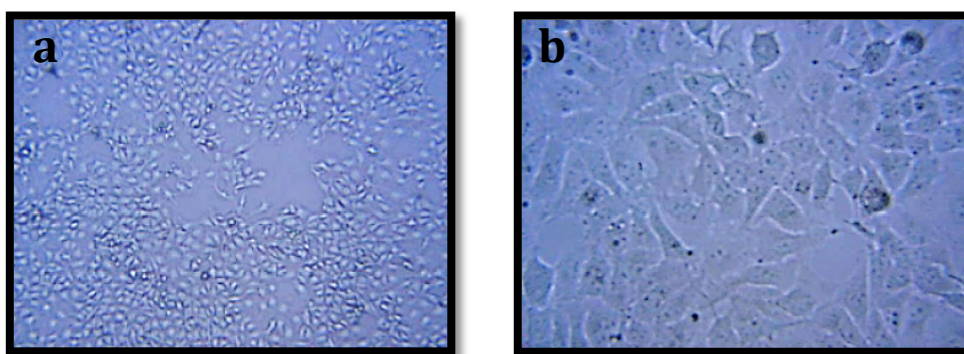


Figure IV.3.3-1
Cellules cultivées sur une surface d'Amonil réticulé, après 24h.
Grandissements $\times 5$ (a) et $\times 20$ (b)

Dépôt et amincissement de la couche

Après l'avoir filtrée pour enlever les résidus, nous déposons la résine sur les réseaux gravés, par *spin-coating*. Nous la recouvrons ensuite sous un tampon de polydiméthylsiloxane (PDMS, 10% de réticulant) transparent, avant de la réticuler par une insolation de 10 minutes sous lampe à ultra-violets (200W). Le tampon est destiné à aplanir la surface de l'Amonil, à la protéger de l'oxygène ambiant qui empêcherait sa réticulation. Il est obtenu en moulant un wafer de silicium cristallin vierge et nettoyé, parfaitement plan. La surface destinée à être en contact avec la résine est préalablement recouverte de quelques couches moléculaires de triméthylchlorosilane (TMCS, déposé par une exposition de 5 minutes à vapeur saturée), ce qui facilite le décollement du tampon après la réticulation de l'Amonil. L'épaisseur obtenue par cette méthode est typiquement de l'ordre de 150nm, bien qu'elle puisse varier selon les conditions d'humidité lors du dépôt par *spincoating*.

Pour réduire l'épaisseur de la couche à moins de 30nm, nous avons d'abord essayé de la graver, par gravure réactive ionique avec plasma couplé par induction¹. Cette approche s'est finalement avérée infructueuse, principalement pour deux raisons. La première est liée à notre méconnaissance de la composition chimique de l'Amonil, qui ne nous a pas été révélée par le constructeur. Sans cette information, il fut difficile de trouver un procédé (*ICP*-)RIE permettant d'obtenir une gravure lente, reproductible et n'altérant pas trop la chimie² ni la faible rugosité de surface de la résine réticulée. La seconde raison est l'impossibilité de surveiller *in situ* l'épaisseur de la résine, pour stopper la gravure à quelques nanomètres du réseau de silicium amorphe. Habituellement, la réflexion d'un faisceau laser normal à la surface de l'échantillon permet de suivre, par interférométrie, l'épaisseur gravée. Cependant, nos échantillons transparents devaient être collés à un substrat de silicium par une colle thermique transparente, afin d'évacuer correctement la chaleur créée par le bombardement ionique. Celle-ci se dilate de manière incontrôlée au cours de la gravure, engendrant un signal d'interférence fluctuant de manière aléatoire, difficile à interpréter.

¹ *ICP*-RIE pour *Inductively Coupled Plasma Reactive Ion Etching*, en anglais

² Une modification de la chimie de surface est notamment susceptible de modifier la biocompatibilité et l'indice optique de la résine.

Nous avons finalement opté pour une autre méthode, plus efficace, et ne nécessitant pas d'étape de gravure. Celle-ci fut développée et effectuée au LPN par Andrea Cattoni, mettant à profit ses travaux sur la lithographie haute-résolution par nano-impression « douce¹ » assistée par UV (*soft UV-NIL*)[173]. La première étape fut de diluer d'avantage la résine Amonil pour diminuer sa viscosité et obtenir une couche plus fine lors du dépôt par *spincoating*. Ensuite, le tampon plat de PDMS fut remplacé par un tampon hybride de PDMS dur (*hard*-PDMS) et souple (PDMS classique). Après l'avoir déposé sur l'échantillon fraîchement enduit d'Amonil, une pression homogène de 200KPa est exercée sur celui-ci à l'aide d'une presse destinée à la nano-impression (Nanonex NXR2500). Cette pression a pour buts de réduire d'avantage l'épaisseur de la couche de résine, et de permettre à celle-ci de bien pénétrer dans les trous. Cependant, l'air présent dans les trous ne peut pas s'évacuer correctement et empêche la résine de totalement les remplir par capillarité. La solution fut d'utiliser le *Degassing Assisted Patterning* (DAP). Initialement développé pour la structuration d'espèces biologiques à une échelle micrométrique[174], ce procédé consiste à dégazer dans un dessiccateur le tampon de PDMS avant de l'appliquer sur la résine. En raison de sa structure poreuse, celui-ci agit alors comme une éponge pendant quelques minutes et absorbe les gaz de son environnement proche, en particulier l'air bloqué dans les trous du réseau. La résine est finalement réticulée par insolation UV. Nous obtenons finalement une épaisseur de résine d'environ 10nm, pour une rugosité de surface, mesurée à l'AFM, de 0.7nm (fluctuations RMS mesurée sur $1\mu\text{m}^2$).

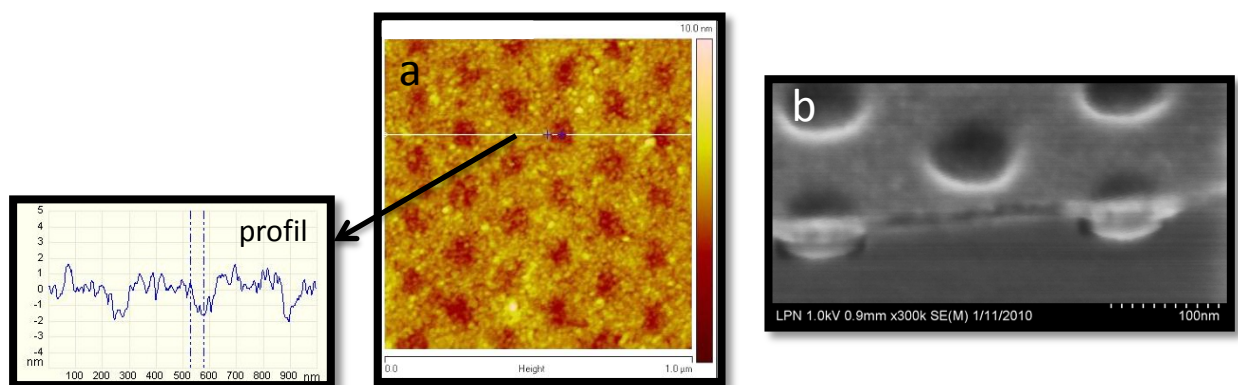


Figure IV.3.3-2
Couche d'Amonil affinée : rugosité de surface mesurée à l'AFM (a) et remplissage des trous observé au SEM (b)

¹ Ce terme provient du fait qu'un tampon nanostructuré « mou » (en PDMS) est utilisé, contrairement à la technique *UV-NIL* classique qui utilise un tampon rigide en verre.

IV.3.4. Résumé du procédé de fabrication

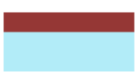







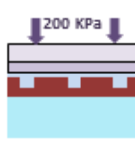
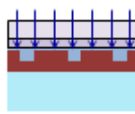

	Étape	Technologie	
Dépôt	Dépôt de aSi:H	Dépôt PECVD	
Lithographie électronique	Dépôt couches PMMA (a) + Al (b)	Tournette (a) + Évaporation (b)	
	Insolation de la résine	Lithographie électronique	
	Retrait de la couche d'Aluminium	Bain NaOH	
	Développement du masque de PMMA	Bain MIBK + isopropanol	
Gravure	Gravure du réseau	Gravure RIE SF ₆ + CHF ₃	
	Retrait du PMMA restant	Gravure RIE O ₂	
Planarisation	Dépôt de la couche d'Amonil	Tournette	
	Planarisation + amincissement de la couche	Presse de nano-imprint + tampon de PDMS dégazé	
	Réticulation de l'Amonil	Insolation UV	
			

Figure IV.3.3-1

Résumé du procédé de fabrication des réseaux résonnants sur lamelle de verre

IV.4. Caractérisation du champ électrique en surface des réseaux résonnants

Malgré le soin apporté à leur fabrication, les réseaux résonnants fabriqués sont susceptibles de ne pas parfaitement correspondre au modèle utilisé dans nos simulations numériques. Avant de faire de l'imagerie super-résolue, nous souhaitons vérifier que leur comportement correspond bien à celui que nous attendons, ou du moins, en reste proche. En particulier, nous voulons savoir si le mode résonant est correctement excité par un faisceau envoyé selon une des 6 directions d'incidence prévues, et si le motif d'intensité lumineuse créé à la surface est bien conforme aux simulations.

Par construction, les fréquences spatiales qui nous intéressent se situent au-delà de la limite de diffraction et ne peuvent donc pas être directement observées en champ lointain. Nous avons eu recours à deux méthodes différentes pour résoudre ou contourner ce problème. Le champ à la surface des réseaux a été directement caractérisé par microscopie optique en champ proche (*SNOM*), et indirectement par fluorescence en champ lointain, en utilisant les basses fréquences obtenues par effet de Moiré pour une excitation à deux ondes (*cf.* IV.2).

IV.4.1. Caractérisation en champ proche

La caractérisation du champ créé en surface des réseaux a été effectuée à l'aide d'un microscope optique en champ proche à ouverture en mode collection, en collaboration avec le Groupe d'optique de champ proche au Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (OCP - ICB). Les mesures que nous présentons ont été principalement effectuées par Geoffroy Scherrer, doctorant dans cette équipe. Les observations ont été menées à la fois sur des réseaux enterrés et non-enterrés, c'est-à-dire fabriqués et optimisés respectivement avec et sans couche de résine Amonil recouvrant les trous du réseau, les seconds étant plus faciles et rapides à réaliser.

Montage expérimental

Sur le microscope en champ proche optique que nous utilisons, une fibre de verre étirée fait office de sonde optique. Elle est fixée par une paraffine à un tube piézoélectrique, qui permet de contrôler ses déplacements par rapport à l'échantillon. Il constitue également l'une des quatre branches d'un pont de Wheatstone, utilisé pour le système d'asservissement. La pointe est placée dans un mode de vibration (latérale) propre, à l'aide d'un générateur basse fréquence alimentant le tube piézoélectrique. Lorsque la sonde est approchée à une dizaine de nanomètres de la surface, les forces de cisaillement (*shear force*) qu'elle subit modifient son mode de vibration propre, la fréquence de vibration imposée par le GBF sort de la résonance, déséquilibrant le pont de Wheatstone. À l'aide d'une boucle de rétrocontrôle pilotée par un ordinateur et agissant sur le tube piézo-électrique, la hauteur de la sonde est asservie autour d'une valeur de consigne (typiquement 10nm) correspondant à un certain déséquilibre du pont de Wheatstone.

Pour exciter le réseau avec le bon angle d'incidence, nous collons celui-ci sur un prisme hémicylindrique (au niveau du centre de courbure), à l'aide d'un gel transparent de même indice que le verre du prisme. Le prisme est ensuite placé sur une platine de rotation, afin que la zone observée se situe dans l'axe de cette platine, qui coïncide également avec la pointe de la sonde optique. En raison de la géométrie de ce montage, seulement deux des six directions équivalentes d'excitation du réseau peuvent être utilisées, à travers deux voies que nous

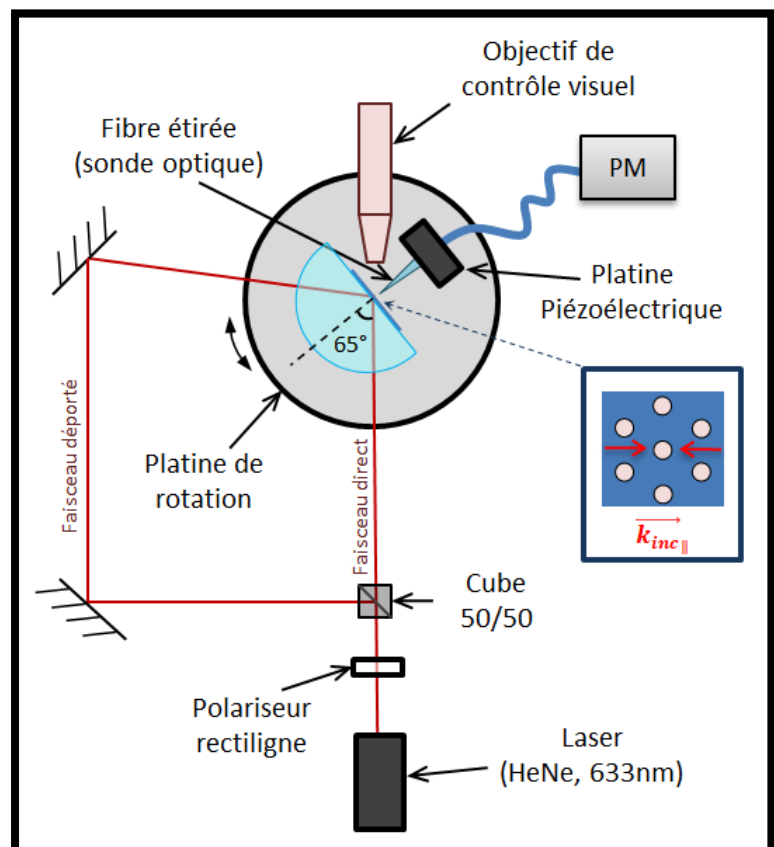


Figure IV.4.1-1

Montage expérimental pour la mesure en champ proche optique

appellerons voie directe et voie déportée (cf. Figure IV.4.1-1).

Excitation avec un seul faisceau

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au champ formé à la surface du réseau, lorsque celui-ci est excité par un seul faisceau. Pour cela, nous avons simplement enlevé le cube séparateur du montage expérimental, pour n'utiliser que le faisceau « direct ». La structure périodique du réseau n'est gravée que sur des zones carrées de $100 \times 100 \mu\text{m}$. Pour mieux voir l'influence du réseau sur le champ mesuré, nous avons réalisé des observations sur les bords d'une zone gravée. La figure ci-dessous montre un exemple de l'intensité du champ électrique que nous avons observée, ainsi que sa transformée de Fourier 2D.

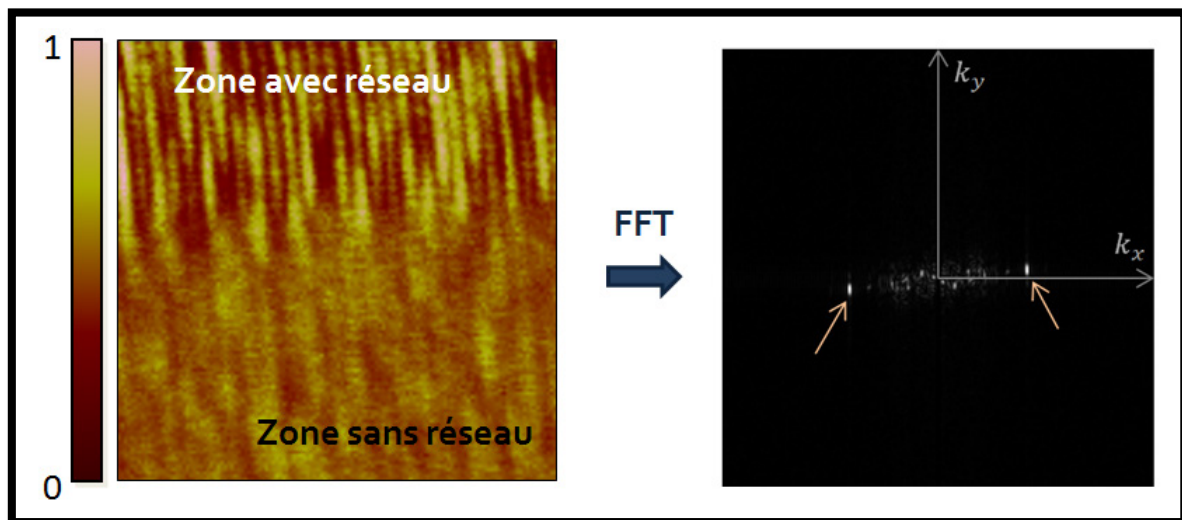


Figure IV.4.1-2

Observation du champ électrique formé par une seule onde incidente au-dessus d'un réseau

Les deux pics désignés par des flèches mettent en évidence une structuration périodique de l'intensité, que l'on peut voir clairement dans la zone avec réseau. La période correspondante est d'environ 190 nm, ce qui correspond bien à ce que prévoyaient les simulations pour le réseau observé. En effet, la grille créée par l'interférence du mode guidé et de l'onde incidente transmise devrait avoir une forme sinusoïdale, de période $d\sqrt{3}/2$ (cf. Éq. (IV.2-a)), où d désigne la distance centre à centre de deux trous voisins. Celle-ci vaut 210nm dans notre cas, ce qui donne une grille de lumière de 182nm de période. La différence de 8nm peut s'expliquer par une dé-calibration des déplacements de la platine

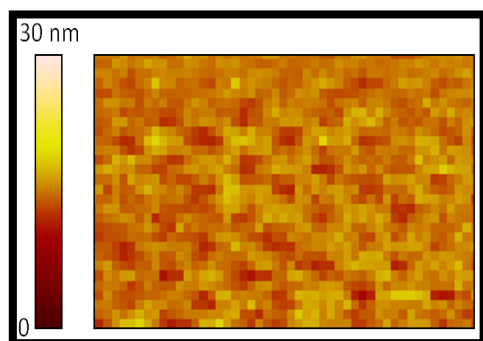


Figure IV.4-3
Exemple d'image topographique
d'un réseau non-enterré où la
répartition hexagonale des trous
est visible

piézoélectrique. Des mesures topographiques effectuées sur un échantillon de référence ont en effet montré une erreur relative sur les distances latérales légèrement supérieure à 10%, et qui n'avait pas été corrigée dans le logiciel d'acquisition d'image au moment des mesures. Cette surévaluation se retrouve par ailleurs sur la période des réseaux non-enterrés, mesurée sur les images topographiques¹ des réseaux non-enterrés : nous mesurons une période d'environ 221nm alors que

celle-ci est normalement de 210nm. La légère structuration périodique du champ que l'on peut deviner dans la zone sans réseau résulte de l'interférence du faisceau incident avec sa propre réflexion (partielle) à l'interface verre-air en sortie du prisme hémicylindrique. Une structuration d'amplitude et de période similaire peut être observée en l'absence d'échantillon sur le prisme hémicylindrique.

Dans le but de vérifier qu'il est bien possible de translater la grille en remplaçant la direction d'excitation par la direction symétrique (cf. IV.2), nous avons utilisé successivement ces deux directions au cours d'une même mesure. Pour cela, nous remplaçons le cube séparateur

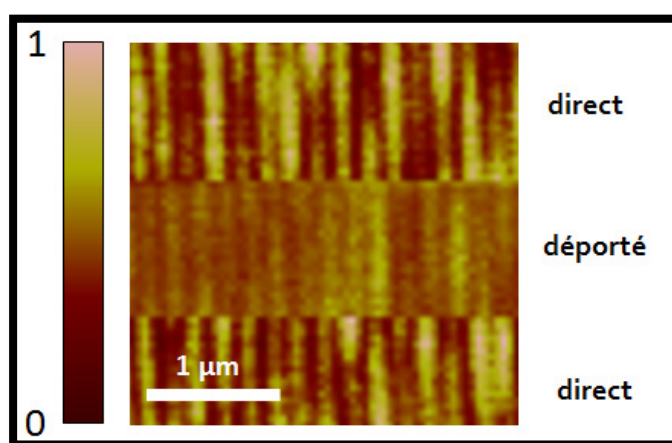


Figure IV.4.1-4
Intensité du champ électrique à la surface d'un
réseau excité successivement selon deux
directions opposées

permettant d'exciter le réseau avec un faisceau déporté en plus du faisceau direct, et nous cachons l'un ou l'autre pendant la mesure. On constate sur la figure ci-contre que le changement d'incidence provoque effectivement un déplacement de la grille de lumière : les franges sombres formées sous une incidence sont systématiquement décalées par rapport à celles formées avec l'autre incidence. Une différence de modulation du signal, d'une incidence à

¹ Les images topographiques sont obtenues grâce au signal d'asservissement en hauteur de la pointe, comme pour un AFM.

l'autre, est également observée. Cela s'explique par le fait que les deux faisceaux n'arrivent pas sur l'échantillon avec un angle rigoureusement identique. De plus, la pointe fibrée se couple d'avantage avec la lumière arrivant d'un côté que de l'autre, en raison de sa forme parfois asymétrique.

Excitation avec deux faisceaux

Nous avons également caractérisé en champ proche le comportement des réseaux avec une excitation par deux ondes planes simultanées (cf. IV.2). Nous utilisons pour cela les deux faisceaux du montage (cf. Figure IV.4.1-1).

Dans cette configuration, les simulations numériques prévoient que l'intensité lumineuse à la surface des réseaux est décrite par la somme de 4 fonctions sinusoïdales, dont les pulsations sont $|2\vec{k}_{inc \parallel}|$, $|\vec{K}_{-1,0}|$, $|\vec{K}_{-1,0} + 2\vec{k}_{inc \parallel}|$, $|2\vec{K}_{-1,0} + 2\vec{k}_{inc \parallel}|$, (cf. Éq. (IV.2-f)). Pour des réseaux dont la période est de 210nm, excités à 633nm avec un angle d'incidence de 65°, les périodes correspondantes valent respectivement : 230nm, 182nm, 873nm et 150nm.

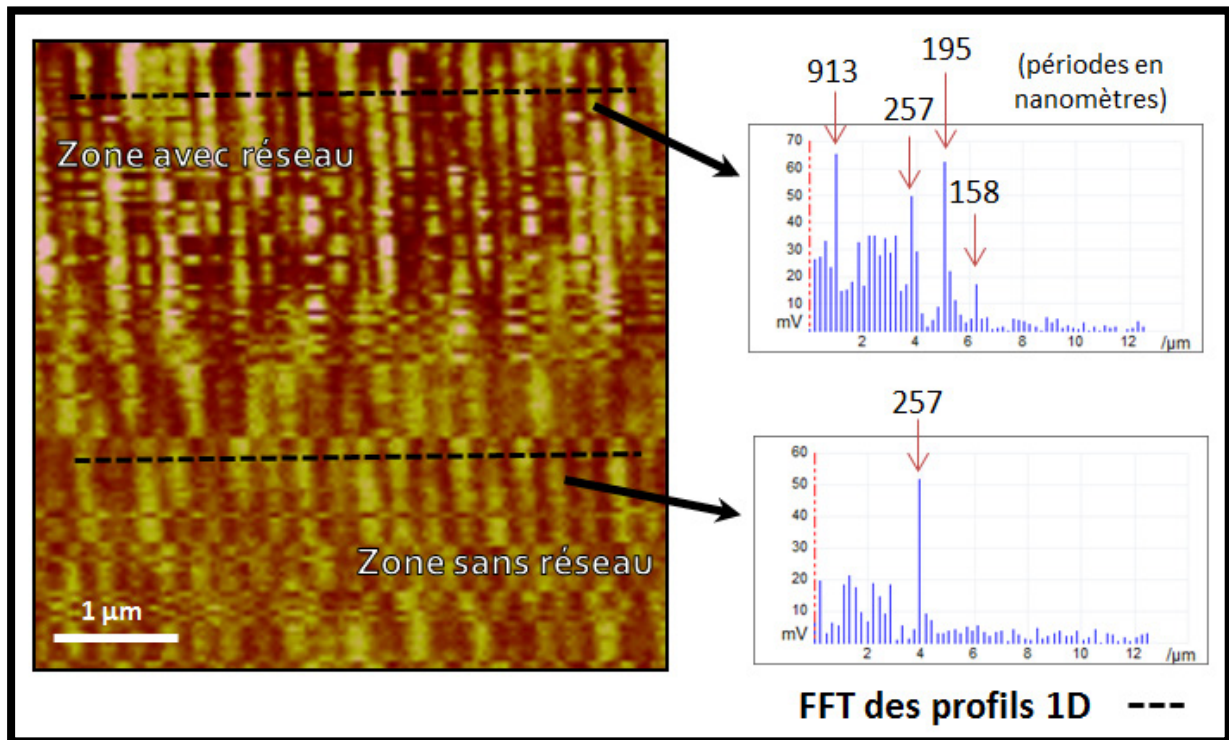


Figure IV.4.1-5

Intensité du champ électrique à la surface d'un réseau excité par deux faisceaux simultanés et transformées de Fourier rapides de profils 1D.

Cette fois encore, nous avons observé les bords d'un réseau pour mieux distinguer l'effet de

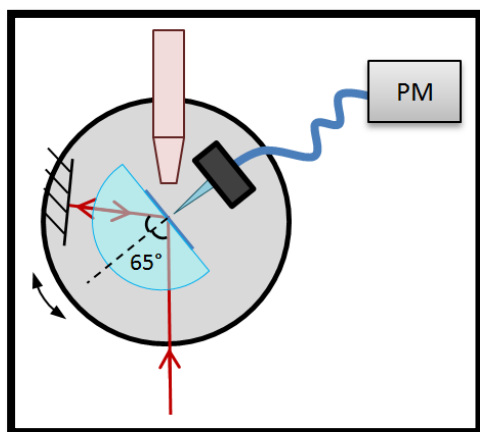


Figure IV.4.1-6
Modification du montage pour
limiter les fluctuations du
déphasage relatif des deux ondes
incidentes

celui-ci sur la distribution d'intensité du champ électrique. Des transformées de Fourier rapides effectuées sur des profils d'intensité perpendiculaires aux franges observées nous permettent de faire ressortir les principales fréquences qui composent les motifs observés. Comme nous pouvons le constater (Figure IV.4.1-5), quatre pics peuvent être observés au-dessus du réseau, tandis qu'un seul d'entre eux subsiste là où la couche de silicium amorphe n'est pas structurée. Les périodes correspondantes (913nm, 257nm, 195nm et 158nm) sont compatibles avec celles

attendues, bien que des différences non-négligeables existent. Tout d'abord, leur précision est limitée par la faible discrétisation en fréquence des transformées de Fourier rapides, effectuées sur une centaine de points de mesure seulement. À cela s'ajoutent des erreurs probables sur la calibration des déplacements latéraux de la sonde, mais également sur l'angle d'incidence des deux faisceaux et l'orientation des réseaux dans le plan (xOy) ¹.

Sur une même image, et indépendamment de la présence du réseau, de nombreux décalages des franges sont visibles. Ils proviennent de déphasages relatifs incontrôlés entre les deux faisceaux incidents. Du cube séparateur jusqu'à l'échantillon, le faisceau déporté suit en effet un parcours différent du faisceau direct, sur une distance supérieure à 1 mètre. Les variations locales de température et les dérives thermiques qui surviennent au cours d'une même mesure² modifient le chemin optique parcouru et donc la différence de

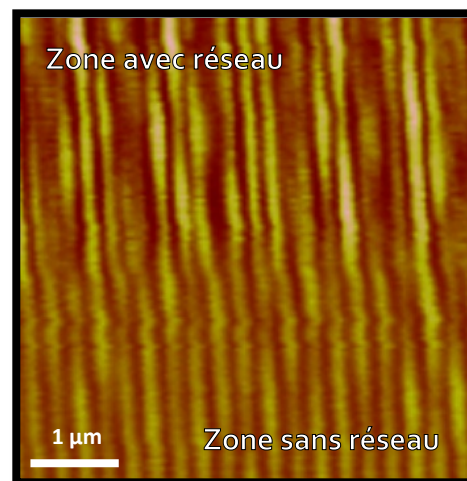


Figure IV.4.1-7
Intensité du champ électrique à la
surface d'un réseau excité
simultanément par un faisceau et sa
réflexion contra-propagative.

¹ Ce qui est susceptible de modifier le module et la direction de $\vec{k}_{inc \parallel}$

² Typiquement une image de 128x128 points mets 640secondes à être mesurée

phase entre les deux faisceaux. Pour corriger ce problème, nous avons supprimé le faisceau déporté, et placé un miroir en sortie du prisme, pour réfléchir dans l'autre sens après un premier passage sur l'échantillon. Un même faisceau sert donc à exciter le réseau dans les deux directions, et seul un aller-retour entre l'échantillon et le miroir différencie cette fois le chemin parcouru. Dans ces conditions, le champ est beaucoup plus stable et les franges ne se décalent plus subitement au cours d'une mesure (cf. Figure IV.4.1-7). Les transformées de Fourier de profils 1D (non montrées) font apparaître les mêmes fréquences sur ces images que dans la configuration avec faisceau déporté.

IV.4.2. Caractérisation en champ lointain

Parallèlement aux mesures en champ proche, nous avons souhaité vérifier la résonance des réseaux en champ lointain, dans les conditions d'utilisation prévues pour faire des images super-résolues sur des échantillons fluorescents. Le montage est identique à celui utilisé pour l'éclairage structuré standard (cf. Figure III.1-2). Bien évidemment, la structuration du champ à haute fréquence que permet d'obtenir le réseau résonnant n'est pas directement observable en champ lointain, puisqu'elle se situe au-delà de la limite de diffraction. Elle peut toutefois être caractérisée de manière indirecte, lorsque le réseau est excité par deux faisceaux à la fois. Dans ce cas, nous avons vu que l'intensité était principalement décrite par quatre termes sinusoïdaux, de pulsations différentes (cf. Éq.(IV.2-f)). Deux d'entre elles sont supérieures à la bande passante de détection du microscope, et ne peuvent donc pas être directement observées. Le terme de pulsation $2|\vec{k}_{inc \parallel}|$, correspondant à l'interférence des deux ordres transmis¹, est tout juste visible en utilisant la réflexion du laser sur le substrat-réseau. Pour une incidence de 65°, il ne l'est en revanche plus du tout dans le signal de fluorescence : le décalage de la longueur d'onde d'émission par rapport à celle d'excitation (*Stokes shift*) suffit à le faire « sortir » de la bande passante du microscope en détection :

$$(n \sin(65^\circ) / \lambda_{0,excitation}) > (NA / \lambda_{0,emission}). \quad (IV.4-a)$$

¹ Il est à ce titre le seul des 4 termes qui subsiste en l'absence de réseau résonnant, et correspond à la grille de lumière qu'on utilise dans le chapitre 3 pour l'éclairage structuré « classique ».

Le quatrième terme, en revanche, se situe largement dans le domaine fréquentiel accessible et pourra donc être directement observé. Il est caractéristique de la résonance du réseau, car il résulte de l'interférence des modes guidés – les ordres $(-1,0)$ – avec les ordres $(0,0)$.

Pour ne pas confondre des fluctuations spatiales de la densité de fluorophores avec celles de la fonction d'illumination, il est souhaitable d'utiliser un objet fluorescent le plus homogène possible. Celui-ci doit également être assez fin pour que la différence de décroissance en z entre l'ordre $(0,0)$ et l'ordre $(-1,0)$ ait une influence limitée. Nous avons choisi d'utiliser un tapis de billes fluorescentes (FluoSpheres, Invitrogen, « crimson fluorescent », $\varnothing 24\text{nm}$), qui satisfait assez bien ces contraintes. Pour l'obtenir, nous déposons $20\mu\text{L}$ d'une solution de billes diluées dans de l'éthanol à la surface d'un réseau enterré. Nous laissons le solvant s'évaporer à l'air libre avant de commencer les mesures.

Les mesures ont été réalisées dans des conditions semblables à celles prévues pour obtenir une image super-résolue : pour chacune des 3 orientations possibles (0° et $\pm 60^\circ$) de la grille de lumière, 8 images ont été enregistrées. Pour chacune d'entre elles, la différence de phase φ entre les deux faisceaux incidents est incrémentée¹ de $\pi/4$ par rapport à la précédente. Nous montrons dans la Figure IV.4.2-2 un exemple d'image obtenue pour chacune des 3 orientations de la grille, ainsi que leurs transformées de Fourier respectives. Ces dernières mettent clairement en évidence la périodicité déjà visible sur les images. Notons que celle-ci n'apparaît pas là où la couche de silicium amorphe n'a pas été gravée (en bas et à gauche sur les images), preuve de l'influence déterminante du réseau sur la structuration du champ. La Figure IV.4.2-1 est un agrandissement de la première image de la IV.4.2-2. On peut y voir la propagation d'un mode guidé dans la couche de silicium amorphe, au-delà de la zone structurée par le réseau de trous (délimité par les pointillés blancs). La différence de période constatée vient du fait que le mode guidé dans la couche homogène et le mode résonnant au niveau du réseau n'ont pas exactement la même constante de propagation (*i.e.* nombre d'onde), comme nous l'avons expliqué dans la section IV.1.3.

¹ Pour cela, nous translatons simplement le réseau de diffraction 1D placé de notre montage, de la même manière que pour l'éclairage structuré standard (*cf.* Figure III.1-2)

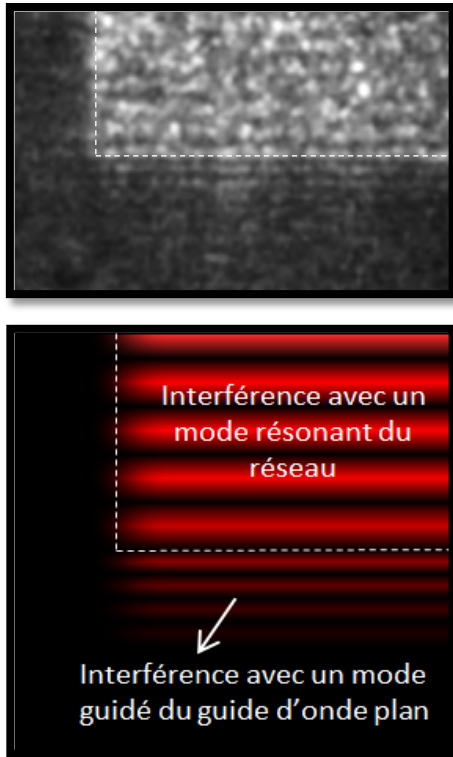


Figure IV.4.2-1
Propagation d'un mode guidé
en bord de réseau : image de
fluorescence et représentation
schématique

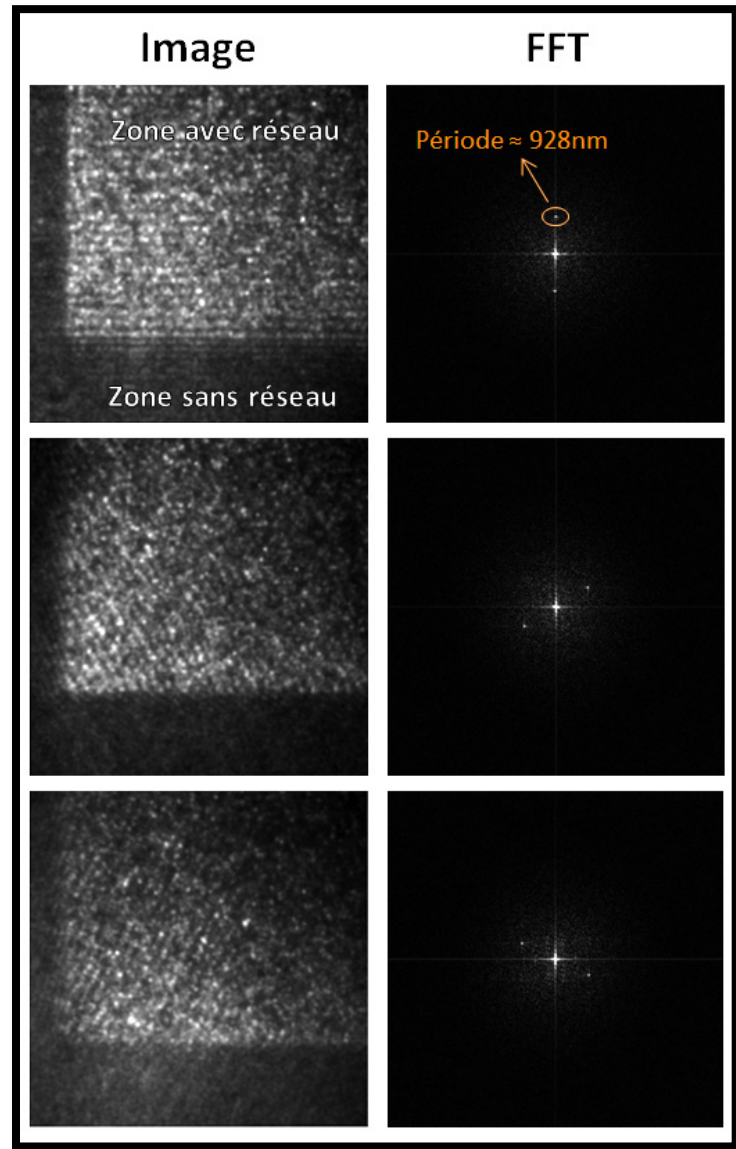


Figure IV.4.2-2
Images de fluorescence de réseaux enterrés
obtenues sous différentes conditions d'excitations

Nous estimons la période à partir de la position des pics dans l'espace de Fourier : 928nm pour les trois directions de la grille. La précision de cette estimation est limitée par celle de la taille apparente des pixels de la caméra, mais surtout par la forme légèrement étalée des pics et la discrétisation de l'espace des fréquences, inhérente à l'algorithme de transformée de Fourier rapide que nous utilisons. D'après l'équation (IV.2-f), le terme de basse fréquence, que nous appellerons I_{BF} , s'écrit¹ :

$$I_{BF}(x, y, z_0) = 4I_{0,0}(z_0)I_{-1,0}(z_0) \cos([\vec{K}_{-1,0} + 2\vec{k}_{inc \parallel}] \cdot \vec{r}_{\parallel} - \varphi) \cos(\phi). \quad (IV.4-b)$$

¹ Les différents termes de cette expression sont explicités dans la section IV.2 (Mode d'éclairage par deux ondes planes)

Nous rappelons que la période correspondant à $|\vec{k}_{-1,0} + 2\vec{k}_{inc\parallel}|$ devrait être de 873nm si les caractéristiques du réseau et les conditions d'éclairage (en particulier l'angle d'incidence des faisceaux) étaient exactement celles prévues. La valeur de 928nm que nous mesurons peut correspondre à de nombreux cas de figure, proches de celui que nous cherchons à reproduire : une augmentation de 1° de l'angle d'incidence des faisceaux en sortie de l'objectif assortie d'une période des réseaux supérieure de 1nm à celle qui est prévue donnerait par exemple une distance interfrange de 921nm.

Si une résonance des réseaux, proche de celle attendue dans les trois directions équivalentes du réseau est clairement démontrée par ces images fixes, nous pouvons également vérifier qu'une modification de la phase relative φ des deux faisceaux incidents a bien l'effet escompté sur I_{BF} . Nous analysons pour cela l'argument de la valeur complexe des pics de l'espace de Fourier. Celle-ci doit être, à une constante $\varphi_0 [2\pi]$ près, égale au φ de l'équation (IV.4-b) qui est également la différence de phase entre les deux faisceaux. Nous avons représenté ci-contre l'argument d'un des pics pour les 8 images où la grille est dans la bonne orientation, ainsi que l'évolution théorique (corrigée d'un *offset*) du terme suivant les conditions de l'expérience (*i.e.* avec un incrément de $\pi/4$ radians à chaque déplacement image). La bonne adéquation des deux montre que la translation/modification de la grille de lumière dans les conditions

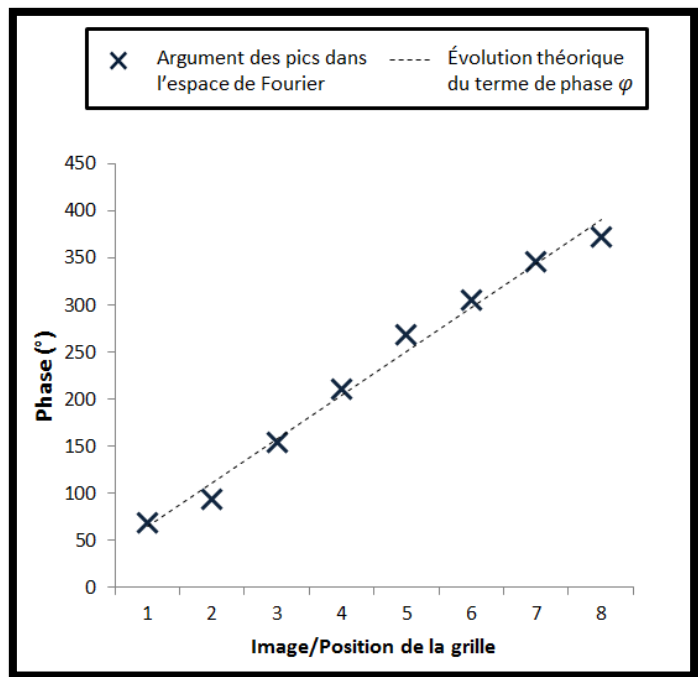


Figure IV.4.2-3.
Étude du déplacement de la grille de lumière *via*
l'argument des pics observés dans l'espace de

expérimentales est bien conforme aux prédictions de nos calculs théoriques, et devrait donc permettre l'obtention d'images super-résolues.

Les résultats de la caractérisation du comportement des réseaux est très encourageante. À ce jour, nous n'avons pas encore obtenu de résultats expérimentaux d'imagerie super-résolue avec ces réseaux. Si des mesures ont bien été effectuées dans des conditions d'imagerie, la connaissance insuffisante du motif d'excitation et le fait qu'il contienne des fréquences situées au-delà de la bande passante de détection du microscope pose problème à l'étape d'inversion pour atteindre la résolution espérée. Nous avons l'intention d'utiliser une version modifiée (par Emeric Mudry) du code d'inversion présenté dans le chapitre précédent, qui permet de retrouver les fonctions d'illumination en même temps que la densité de fluorophores. Des informations *a priori* sur les motifs d'illuminations (orientation et fréquences approximatives des grilles de lumière) nous ont permis d'obtenir des premiers résultats prometteurs, bien que non présentables à l'heure où nous achevons la rédaction de ce manuscrit.

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce mémoire visent à améliorer la résolution des microscopes optiques. Notre approche consiste à enregistrer plusieurs images de l'objet sous différents éclairagements inhomogènes et à les combiner numériquement pour reconstituer une carte de l'échantillon. Ce concept, que l'on appelle synthèse d'ouverture, est appliqué en microscopie (cohérente) de diffraction, et en microscopie (incohérente) de fluorescence. Il permet de tirer profit de la bande passante de détection et de celle d'illumination pour obtenir une résolution bien meilleure que celle obtenue en microscopie large-champ classique.

Ces techniques requièrent l'utilisation d'algorithmes d'inversion pour retrouver une estimation de l'objet qui satisfait au mieux les données mesurées. Il faut pour cela relier la mesure fournie par le microscope à l'échantillon et à l'éclairage. Les écarts entre le modèle et la réalité sont généralement une source d'artéfacts dans la reconstruction, et de diminution de la résolution. Ils sont particulièrement susceptibles de se produire lorsque le modèle utilisé est simplifié, pour faciliter l'opération d'inversion. Nos travaux montrent que l'utilisation d'algorithmes qui reposent sur des modélisations rigoureuses de l'interaction onde-objet et de la formation de l'image peut dans certains cas améliorer la résolution de l'image obtenue, et dans d'autres cas réduire les contraintes expérimentales.

En tomographie optique de diffraction, l'approximation de Born est généralement utilisée pour linéariser la modélisation physique du processus de diffraction. Nous avons proposé une méthode d'inversion qui n'utilise pas cette approximation, et montré qu'elle donnait généralement des résultats bien meilleurs que les méthodes linéaires. La prise en compte de la diffusion multiple nous a notamment permis d'améliorer significativement la résolution de nos reconstructions sur des objets fortement diffractants.

En microscopie de fluorescence à éclairage structuré (*Structured Illumination Microscopy*) nous avons introduit un algorithme d'inversion capable de reconstruire l'objet fluorescent

sans connaître les différents motifs d'illumination. Avec cet algorithme, il n'est plus nécessaire d'utiliser une grille de lumière parfaitement connue et contrôlée pour reconstruire une image super-résolue d'un objet fluorescent. Il est par exemple possible de remplacer celle-ci par un speckle aléatoire, obtenu en éclairant un simple diffuseur. Notre approche permet de simplifier grandement la mise en œuvre expérimentale de la microscopie à éclairage structuré.

Enfin, nous avons proposé une technique pour améliorer la résolution des techniques d'imagerie de surface par éclairage structuré, sans utiliser de phénomène non-linéaire. Pour cela, nous avons conçu une structure périodique et diélectrique de dimensions nanométriques, qui permet de former à la surface de l'échantillon une grille de lumière évanescente. La période de la grille étant largement *sub*-diffraction, elle permet théoriquement d'avoir accès aux très hautes fréquences spatiales de l'échantillon. Nous avons montré expérimentalement qu'une telle grille de lumière peut être réalisée avec un réseau résonant et que la grille peut être translatée et tournée changeant simplement l'éclairage.

Les résultats théoriques et expérimentaux que nous avons obtenus sur ces trois axes de recherche sont très encourageants et ils ouvrent de nombreuses perspectives.

En tomographie optique de diffraction, le modèle et l'algorithme d'inversion doivent être étendus au cas général d'un échantillon 3D. Une fois cela réalisé, nous pouvons espérer que l'amélioration de la résolution par la diffusion multiple nous permettra de caractériser des échantillons fortement diffractants, tels que des composants de micro-électronique, avec une excellente résolution et une information quantitative sur leur matériaux, via la permittivité diélectrique. Le montage expérimental peut être amélioré, en particulier pour réduire le temps d'acquisition, en accélérant le changement d'angle d'incidence avec des miroirs galvanométriques ou des déflecteurs acousto-optiques, en isolant d'avantage le montage pour diminuer le bruit, ou encore en utilisant une caméra plus rapide. L'échantillon peut également être observé dans d'autres configurations, en le plaçant sur un miroir par exemple. Enfin, de nouvelles régularisations à partir d'informations *a priori* pourraient être ajoutées à l'algorithme d'inversion : homogénéité locale de la permittivité, connaissance des

matériaux qui composent l'échantillon pour améliorer encore la résolution de la reconstruction.

Actuellement, le modèle d'imagerie de fluorescence par éclairage structuré que nous utilisons ne considère que des échantillons 'plats', placés au plan focal objet du microscope. En d'autres termes, la fluorescence hors focus est très mal prise en compte. Un travail important consistera à modéliser correctement la fluorescence hors focus afin de pouvoir traiter des échantillons réalistes tridimensionnels.

Une autre perspective très prometteuse concerne l'imagerie de surface à très haute résolution. Dans un premier temps le développement de l'imagerie de surface super-résolue utilisant les réseaux résonants doit être poursuivi sur des échantillons fluorescents d'intérêt. Dans un second temps, on pourra aussi envisager d'utiliser des speckles évanescents, formés à partir d'ondes arrivant en réflexion totale interne à travers un substrat d'indice élevé [175] ou métallisé [159] pour améliorer la résolution avec une mise en œuvre expérimentale beaucoup plus simple. Dans les deux cas, il faudra améliorer l'algorithme d'inversion pour que celui-ci puisse tirer profit des fréquences spatiales de l'éclairage situées en dehors de l'ouverture numérique de détection.

Annexe A : Montage avec modulateur spatial de lumière

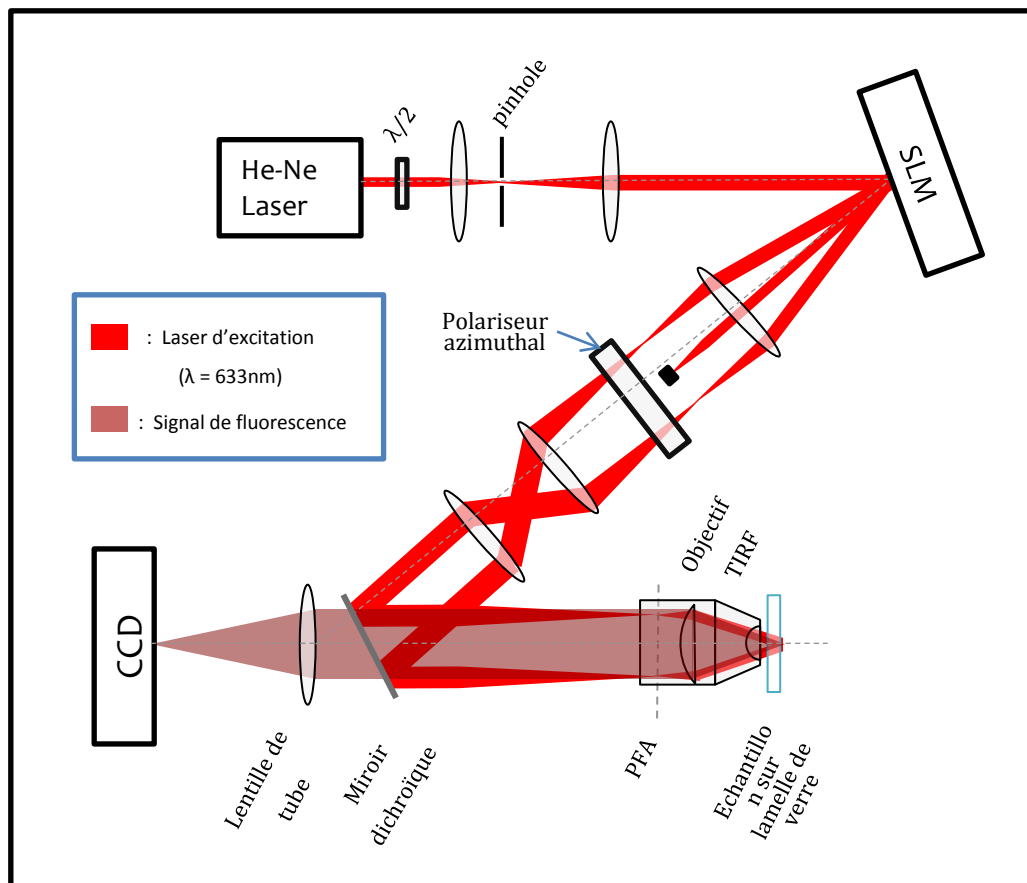


Figure A-1 - Schéma du montage optique avec SLM

Le premier montage que nous avons mis en place pour l'éclairage structuré en réflexion totale interne est très proche de celui proposé par Fiolka et al. [136]. Il utilise un modulateur spatial de lumière en réflexion (SLM¹) pour créer les deux faisceaux qui formeront la grille de lumière. Cet appareil est particulièrement intéressant pour sa rapidité d'affichage donnant accès à des acquisitions effectuées à une vitesse « vidéo » [176], ainsi que pour la flexibilité qu'il permet dans l'affichage de masques de phase [177,178]. Notre SLM (Holoeye PLUTO-VIS) fonctionne comme un écran pixellisé standard, que l'on branche sur la sortie vidéo (DVI)

¹ « Spatial Light Modulator »

d'un ordinateur. Une image en niveaux de gris est affichée sur un écran réfléchissant à cristaux liquides. En plus d'un miroir, chaque pixel est constitué d'une cellule à l'intérieure de laquelle se trouvent un cristal liquide en phase nématique¹. Selon le niveau de gris du pixel, une tension moyenne est appliquée aux bornes de la cellule, ce qui a pour effet de changer l'orientation des molécules, modifiant l'indice optique effectif de la cellule. Le chemin optique correspondant à un aller-retour de la lumière est ainsi ajusté pour chaque pixel, et la forme du front d'onde réfléchi est transformée en conséquence. En affichant un réseau de phase unidimensionnel sur le SLM placé dans un plan conjugué au plan focal objet de l'objectif, nous pouvons utiliser les ordres +1 et -1 de diffraction d'un faisceau incident pour former une grille de lumière au niveau de l'échantillon. Pour récupérer le maximum d'énergie dans ces ordres et éviter des effets du cisaillement sur la période effective du réseau (cf. [136]), nous calculons directement la phase du champ électrique issu de l'interférence de deux ondes planes sur le SLM. Le résultat est un réseau de phase binaire, constitué de sauts de phase de π . Sa période est choisie en prenant en compte le grandissement des lentilles et de l'objectif entre l'échantillon et le SLM. Typiquement, une période de 8 pixels permettait d'obtenir un profil d'intensité de 230nm de période au niveau de l'échantillon, ce qui indique que l'angle d'incidence (polaire) des faisceaux au niveau de la lamelle de verre sur laquelle repose l'échantillon était de 65° par rapport à la normale. Pour obtenir le bon déphasage à chaque pixel, nous avons préalablement calibré la correspondance entre les niveaux de gris affichés et le déphasage effectif pour la longueur d'onde du laser utilisé (633nm), en suivant pour cela les instructions du constructeur.

Nous nous sommes heurtés à plusieurs problèmes lors de l'utilisation de notre SLM. Certains d'entre eux sont connus du fabricant, et ils sont liés à la nature pixellisée et anisotrope de l'écran à cristaux liquides. Le premier est dû au pilotage numérique de l'orientation des cristaux liquides. Celle-ci n'est pas déterminée par une tension fixe mais par des trains de tension. En raison d'une viscosité non-nulle, ces trains de tension conduisent à une orientation moyenne des cristaux, opérant ainsi une conversion numérique-analogique « physique ». Malheureusement, des fluctuations rapides de l'orientation et donc du déphasage de chaque pixel subsistent parfois, ce qui pose des problèmes de stabilité lors

¹ C'est-à-dire constitué de molécules de forme allongées, souvent représentées par des bâtonnets localement dirigés dans une même direction

d'une mesure. Ensuite, des effets de proximité peuvent modifier la phase effective de pixels voisins, lorsque leur niveau de gris est très différent, ce qui provoque un adoucissement de profils de phase contrasté. C'est particulièrement le cas pour nos réseaux binaires de petite période. Troisièmement, la structure nématique des cristaux liquides est, par définition, anisotrope. Il en résulte que l'efficacité de diffraction des réseaux de phases n'est pas invariante selon leur direction, ce qui posait problème lorsque nous souhaitions changer l'orientation de la grille de lumière. Enfin, nous avons observé des fluctuations lentes et d'amplitude importante dans l'efficacité de diffraction de nos réseaux de phase. Malgré plusieurs échanges avec le constructeur du SLM, nous n'avons pas réussi à trouver l'origine de ce problème particulièrement gênant et avons finalement décidé d'abandonner son utilisation au profit d'un réseau en transmission gravé, plus stable.

Bibliographie

- [1] E. Abbe, *Archiv Für Mikroskopische Anatomie* **9**, 413-418 (1873).
- [2] P Dedecker, J Hofkens, and J Hotta, *Materials Today* **11**, 12-21 (2008).
- [3] Yuval Garini, Bart J Vermolen, and Ian T Young, *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 3-12 (2005).
- [4] Rainer Heintzmann and Gabriella Ficz, *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* **5**, 289-301 (2006).
- [5] S.W. Hell, *Science* **316**, 1153-1158 (2007).
- [6] I. J. Cox and C J R Sheppard, *Journal of the Optical Society of America A* **3**, 1152 (1986).
- [7] W. Lukosz, *Journal of the Optical Society of America* **57**, 932 (1967).
- [8] W. Lukosz, *Journal of the Optical Society of America* **56**, 1463 (1966).
- [9] Rayleigh Lord, *Philosophical Magazine* **42**, 167–195 (1896).
- [10] G.B. Airy, *Trans. Cambridge Phil. Soc.* **5**, 283-291 (1835).
- [11] C.M. Sparrow, *Astrophys. J* **44**, 76-86 (1916).
- [12] G. J. R. Sheppard and H. J. Matthews, *Journal of the Optical Society of America A* **4**, 1354 (1987).
- [13] Olivier Haeberlé, *Optics Communications* **235**, 1-10 (2004).
- [14] N. Streibl, *Journal of the Optical Society of America A* **2**, 121 (1985).
- [15] Keigo Iizuka, *Elements of Photonics - Volume I: In Free Space and Special Media* (2002), pp. 0-471.
- [16] Rudolf Kingslake and R. Barry Johnson, *Lens Design Fundamentals*, Academic P (Boston, 2010), p. 549.
- [17] B. Richards and E. Wolf, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences (1934-1990)* **253**, 358-379 (1959).
- [18] H H Hopkins, *Proceedings of the Physical Society* **58**, 92-99 (1946).
- [19] M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics*, 7th ed. (1999).
- [20] Bernard Valeur, *Molecular Fluorescence Principles and Applications* (2002), p. 381.
- [21] Roger Y Tsien, Lauren Ernst, and Alan Waggoner, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, edited by James B Pawley (Springer, 2006), pp. 338-352.

- [22] Olivier Haeberlé, M Ammar, H Furukawa, K Tenjimbayashi, and P Török, *Optics Express* **11**, 2964-9 (2003).
- [23] Guillaume Baffou, Christian Girard, and Romain Quidant, *Physical Review Letters* **104**, 1-4 (2010).
- [24] C J R Sheppard and P Török, *Bioimaging* **5**, 205-218 (1997).
- [25] Peter T C So, H S Kwon, and C Y Dong, *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision* **18**, 2833-45 (2001).
- [26] G. Arfken and Hans Jürgen Weber, in *Mathematical Methods for Physicists*, edited by Academic Press, 3rd ed. (1985), pp. 810-814.
- [27] M Arnison, *Optics Communications* **211**, 53-63 (2002).
- [28] Rainer Heintzmann and Christoph Cremer, *Laterally Modulated Excitation Microscopy: Improvement of Resolution by Using a Diffraction Grating* (SPIE, 1998), pp. 185-196.
- [29] Anne Sentenac, Hugues Giovannini, and Olivier Haeberlé, *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* (2007).
- [30] Mats G L Gustafsson, *Journal of Microscopy* **198**, 82-7 (2000).
- [31] MGL Gustafsson, DA Agard, and John W Sedat, *Journal of Microscopy* **195**, 10–16 (1999).
- [32] Lothar Schermelleh, Peter M Carlton, Sebastian Haase, Lin Shao, Lukman Winoto, Peter Kner, Brian Burke, M C Cardoso, David A Agard, Mats G L Gustafsson, H Leonhardt, and John W Sedat, *Science (New York, N.Y.)* **320**, 1332-6 (2008).
- [33] Antonio Virgilio Failla, Udo Spoeri, Benno Albrecht, Alexander Kroll, and Christoph Cremer, *Applied Optics* **41**, 7275 (2002).
- [34] Kai Wicker and Rainer Heintzmann, *Journal of Optics* **12**, 084010 (2010).
- [35] C. G. Galbraith and J. a. Galbraith, *Journal of Cell Science* **124**, 1607-1611 (2011).
- [36] Bo Huang, *Current Opinion in Chemical Biology* **14**, 10-4 (2010).
- [37] L. Schermelleh, Rainer Heintzmann, and H. Leonhardt, *The Journal of Cell Biology* **190**, 165-175 (2010).
- [38] Bo Huang, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang, *Annual Review of Biochemistry* **78**, 993-1016 (2009).
- [39] E H Synge, *Philosophical Magazine* **6**, 356 (1928).
- [40] E H Synge, *Philosophical Magazine* **13**, 297 (1932).
- [41] E. A. Ash and G. Nicholls, *Nature* **237**, 510-512 (1972).

- [42] A Lewis, M Isaacson, A Harootunian, and A Muray, *Ultramicroscopy* **13**, 227-231 (1984).
- [43] D. W. Pohl, W. Denk, and M. Lanz, *Applied Physics Letters* **44**, 651 (1984).
- [44] Eric Betzig and J K Trautman, *Science (New York, N.Y.)* **257**, 189-95 (1992).
- [45] J Pendry, *Physical Review Letters* **85**, 3966-9 (2000).
- [46] Nicholas Fang, Hyesog Lee, Cheng Sun, and Xiang Zhang, *Science (New York, N.Y.)* **308**, 534-7 (2005).
- [47] J B Pendry and S Anantha Ramakrishna, *Journal of Physics: Condensed Matter* **14**, 8463-8479 (2002).
- [48] J Pendry, *Optics Express* **11**, 755-60 (2003).
- [49] Zhaowei Liu, Hyesog Lee, Yi Xiong, Cheng Sun, and Xiang Zhang, *Science (New York, N.Y.)* **315**, 1686 (2007).
- [50] D Axelrod, *Biophysical Tools for Biologists - Chap. 8: Total Internal Reflection Microscopy* (Elsevier, 2008), pp. 169-221.
- [51] D. Axelrod, *The Journal of Cell Biology* **89**, 141-145 (1981).
- [52] Daniel Axelrod, *Methods in Enzymology* **361**, 1-33 (2003).
- [53] Anne Sentenac and Patrick C Chaumet, *Physical Review Letters* **013901**, 2-5 (2008).
- [54] Anne Sentenac, Patrick Chaumet, and Kamal Belkebir, *Physical Review Letters* **97**, 15-18 (2006).
- [55] Anne Sentenac, Kamal Belkebir, Hugues Giovannini, and Patrick C Chaumet, *Journal of the Optical Society of America A* **26**, 2550 (2009).
- [56] J. L. Harris, *Journal of the Optical Society of America* **54**, 931 (1964).
- [57] P. J. Sementilli, B. R. Hunt, and M. S. Nadar, *Journal of the Optical Society of America A* **10**, 2265 (1993).
- [58] G. R. Ayers and J. C. Dainty, *Optics Letters* **13**, 547 (1988).
- [59] Timothy J. Holmes, *Journal of the Optical Society of America A* **9**, 1052 (1992).
- [60] Timothy J Holmes, David Biggs, and Asad Abu-tarif, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (2006), pp. 468-487.
- [61] E Thi, J Conan, and A History, *America* **12**, (1995).
- [62] T. S. Karpova, *The Journal of Cell Biology* **142**, 1501-1517 (1998).
- [63] P. J Verveer, M. J Gemkow, and T. M Jovin, *Journal of Microscopy* **193**, 50-61 (1999).

- [64] Jason R Swedlow, Ke Hu, Paul D Andrews, David S Roos, and John M Murray, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 2014-9 (2002).
- [65] J G McNally, T Karpova, J Cooper, and J a Conchello, *Methods (San Diego, Calif.)* **19**, 373-85 (1999).
- [66] Peter J Shaw, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (2006).
- [67] D A Agard, Y Hiraoka, P Shaw, and John W Sedat, *Methods in Cell Biology* **30**, 353-77 (1989).
- [68] Giuseppe Vicidomini, S.W. Hell, and A. Schönle, *Optics Letters* **34**, 3583–3585 (2009).
- [69] A.M. van Oijen, *Chemical Physics Letters* **292**, 183-187 (1998).
- [70] J Gelles, B J Schnapp, and M P Sheetz, *Nature* **331**, 450-3 (1988).
- [71] R Thompson, Daniel R. Larson, and Watt W. Webb, *Biophysical Journal* **82**, 2775-2783 (2002).
- [72] Michael J Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang, *Nature Methods* **3**, 793-5 (2006).
- [73] Samuel T Hess, Thanu P K Girirajan, and Michael D Mason, *Biophysical Journal* **91**, 4258-72 (2006).
- [74] Alexey Sharonov and Robin M Hochstrasser, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18911-6 (2006).
- [75] Gregory Giannone, Eric Hosy, Florian Levet, Audrey Constals, Katrin Schulze, Alexander I Sobolevsky, Michael P Rosconi, Eric Gouaux, Robert Tampé, Daniel Choquet, and Laurent Cognet, *Biophysical Journal* **99**, 1303-10 (2010).
- [76] Michael K Cheezum, William F Walker, and William H Guilford, *Biophysical Journal* **81**, 2378-88 (2001).
- [77] Ahmet Yildiz, Joseph N Forkey, Sean a McKinney, Taekjip Ha, Yale E Goldman, and Paul R Selvin, *Science (New York, N.Y.)* **300**, 2061-5 (2003).
- [78] Hari Shroff, Catherine G Galbraith, James A Galbraith, and Eric Betzig, *Nature Methods* **5**, 417-423 (2008).
- [79] Fedor V Subach, George H Patterson, Suliana Manley, Jennifer M Gillette, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Vladislav V Verkhusha, *Nature Methods* **6**, 153-9 (2009).
- [80] Konstantin A Lukyanov, Dmitry M Chudakov, Sergey Lukyanov, and Vladislav V Verkhusha, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **6**, 885-91 (2005).

- [81] Marta Fernández-Suárez and Alice Y Ting, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **9**, 929-43 (2008).
- [82] Gleb Shtengel, James A Galbraith, Catherine G Galbraith, Jennifer Lippincott-schwartz, Jennifer M Gillette, Suliana Manley, Rachid Sougrat, Clare M Waterman, Pakorn Kanchanawong, Michael W Davidson, Richard D Fetter, and Harald F Hess, *Pnas* (2008).
- [83] Daniel Aquino, Andreas Schönle, Claudia Geisler, Claas v Middendorff, Christian A Wurm, Yosuke Okamura, Thorsten Lang, S.W. Hell, and Alexander Egner, *Nature Methods* (2011).
- [84] Bo Huang, Wenqin Wang, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang, *Science (New York, N.Y.)* **319**, 810-3 (2008).
- [85] Bo Huang, Sara A Jones, Boerries Brandenburg, and Xiaowei Zhuang, *Nature Methods* **5**, 1047-52 (2008).
- [86] Sri Rama Prasanna Pavani, Michael A Thompson, Julie S Biteen, Samuel J Lord, Na Liu, Robert J Twieg, Rafael Piestun, and W E Moerner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2995-9 (2009).
- [87] Manuel F Juette, Travis J Gould, Mark D Lessard, Michael J Mlodzianoski, Bhupendra S Nagpure, Brian T Bennett, Samuel T Hess, and Joerg Bewersdorf, *Nature Methods* **5**, 527-9 (2008).
- [88] Rainer Heintzmann and Mats G L Gustafsson, *Nature Photonics* **3**, 362-364 (2009).
- [89] W Denk, J. Strickler, and W. Webb, *Science* **248**, 73-76 (1990).
- [90] Rainer Heintzmann, Thomas M Jovin, and Christoph Cremer, *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision* **19**, 1599-609 (2002).
- [91] Mats G L Gustafsson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13081-6 (2005).
- [92] R Heintzmann, *Micron* **34**, 283-291 (2003).
- [93] S.W. Hell and J Wichmann, *Optics Letters* **19**, 780-2 (1994).
- [94] S.W. Hell, Katrin I Willig, Marcus Dyba, Stefan Jakobs, Lars Kastrup, and Volker Westphal, in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, edited by James B Pawley (2006), pp. 571-579.
- [95] Volker Westphal and Stefan Hell, *Physical Review Letters* **94**, 1-4 (2005).

- [96] Katrin I Willig, Silvio O Rizzoli, Volker Westphal, Reinhard Jahn, and Stefan W Hell, *Nature* **440**, 935-9 (2006).
- [97] Katsumasa Fujita, Minoru Kobayashi, Shogo Kawano, Masahito Yamanaka, and Satoshi Kawata, *Physical Review Letters* **99**, 1-4 (2007).
- [98] Masahito Yamanaka, Shogo Kawano, Katsumasa Fujita, Nicholas I Smith, and Satoshi Kawata, *Journal of Biomedical Optics* **13**, 050507 (2010).
- [99] Ulf Schnars and Werner Jüptner, *Digital Holography* (2005), p. 164.
- [100] D. Gabor, *Nature* **161**, 777-778 (1948).
- [101] Florian Charrière, Anca Marian, Frédéric Montfort, Jonas Kuehn, Tristan Colomb, Etienne Cuche, Pierre Marquet, and Christian Depeursinge, *Optics Letters* **31**, 178-80 (2006).
- [102] E Cuche, P Marquet, and C Depeursinge, *Applied Optics* **38**, 6994-7001 (1999).
- [103] Wonshik Choi, Christopher Fang-Yen, Kamran Badizadegan, Seungeun Oh, Niyom Lue, Ramachandra R Dasari, and Michael S Feld, *Nature Methods* **4**, 717-9 (2007).
- [104] Julien Savatier, Pierre Bon, Didier Marguet, and Serge Monneret, *Biophysical Journal* **100**, 356a-356a (2011).
- [105] Benjamin Rappaz, Pierre Marquet, Etienne Cuche, Yves Emery, Christian Depeursinge, and Pierre J. Magistretti, *Optics Express* **13**, 9361 (2005).
- [106] E Wolf, *Optics Communications* **1**, 153-156 (1969).
- [107] V Lauer, *Journal of Microscopy* **205**, 165-76 (2002).
- [108] Sergey Alexandrov, Timothy Hillman, Thomas Gutzler, and David Sampson, *Physical Review Letters* **97**, 1-4 (2006).
- [109] Alexander Neumann, Yuliya Kuznetsova, and S R J Brueck, *Optics Express* **16**, 15886-15891 (2008).
- [110] Vicente Mico, Zeev Zalevsky, Pascuala García-Martínez, and Javier García, *Journal of the Optical Society of America A* **23**, 3162 (2006).
- [111] J Greffet, *Optics Communications* **72**, 274-278 (1989).
- [112] Anthony Dubois, Kamal Belkebir, and Marc Saillard, *Inverse Problems* **20**, S63-S79 (2004).
- [113] H. Ayasso, B. Duchêne, and A. Mohammad-Djafari, *Journal of Modern Optics* **57**, 765-776 (2010).

- [114] L Souriau, B Duchêne, D Lesselier, and R E Kleinman, *Inverse Problems* **12**, 463-481 (1996).
- [115] Kamal Belkebir and Anne Sentenac, *Journal of the Optical Society of America A* **20**, 1223 (2003).
- [116] Kamal Belkebir, Patrick C Chaumet, and Anne Sentenac, *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision* **22**, 1889-97 (2005).
- [117] Kamal Belkebir, Patrick C Chaumet, and Anne Sentenac, *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision* **23**, 586-95 (2006).
- [118] Guillaume Maire, Filip Drsek, Jules Girard, Hugues Giovannini, Anne Talneau, Denis Konan, Kamal Belkebir, Patrick Chaumet, and Anne Sentenac, *Physical Review Letters* **102**, 1-4 (2009).
- [119] Jules Girard, Guillaume Maire, Hugues Giovannini, Anne Talneau, Kamal Belkebir, Patrick Chaumet, and Anne Sentenac, *Physical Review A* **82**, 2-5 (2010).
- [120] Kamal Belkebir and Anton G Tjhuis, *Inverse Problems* **17**, 1671-1688 (2001).
- [121] William H. Press, Saul A. Teukolsky, William T. Vetterling, and Brian P. Flannery, *Numerical Recipes 3rd Edition: The Art of Scientific Computing* (Cambridge University Press, 2007), p. 1256.
- [122] R Kleinman, *Journal of Computational and Applied Mathematics* **42**, 17-35 (1992).
- [123] Vincent Lauer, *Observation of Biological Objects Using an Optical Diffraction Tomographic Microscope* (SPIE, 2000), pp. 122-133.
- [124] J. H. Bruning, D. R. Herriott, J. E. Gallagher, D. P. Rosenfeld, A. D. White, and D. J. Brangaccio, *Applied Optics* **13**, 2693 (1974).
- [125] Ichirou Yamaguchi and Tong Zhang, *Optics Letters* **22**, 1268 (1997).
- [126] Guillaume Maire, Jules Girard, Filip Drsek, Hugues Giovannini, Anne Talneau, Kamal Belkebir, Patrick Chaumet, and Anne Sentenac, *Journal of Modern Optics* **57**, 746-755 (2010).
- [127] Guy Cox and Colin J R Sheppard, *Microscopy Research and Technique* **63**, 18-22 (2004).
- [128] Min Gu and C. J. R. Sheppard, *Journal of the Optical Society of America A* **9**, 151 (1992).
- [129] M a Neil, R Juskaitis, and T Wilson, *Optics Letters* **22**, 1905-7 (1997).

- [130] Mats G L Gustafsson, Lin Shao, Peter M Carlton, C J Rachel Wang, Inna N Golubovskaya, W Zacheus Cande, David a Agard, and John W Sedat, *Biophysical Journal* **94**, 4957-70 (2008).
- [131] Rainer Heintzmann, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (2006), pp. 265-279.
- [132] Peter T C So and G E Cragg, *Optics Letters* **25**, 46-8 (2000).
- [133] Andreas Stemmer, J T Frohn, and H F Knapp, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 7232-6 (2000).
- [134] Euiheon Chung, Daekeun Kim, and Peter T C So, *Optics Letters* **31**, 945-7 (2006).
- [135] Euiheon Chung, Daekeun Kim, Yan Cui, Yang-Hyo Kim, and Peter T C So, *Biophysical Journal* **93**, 1747-57 (2007).
- [136] Reto Fiolka, Markus Beck, and Andreas Stemmer, *Optics Letters* **33**, 1629-31 (2008).
- [137] Olga Gliko, William E Brownell, and Peter Saggau, *Optics Letters* **34**, 836-8 (2009).
- [138] James B Pawley, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (2006).
- [139] S. Nader S. Reihani and Lene B. Oddershede, *Optics Letters* **32**, 1998 (2007).
- [140] M J Booth and T Wilson, *Journal of Biomedical Optics* **6**, 266-72 (2001).
- [141] Tuan Q Pham, Marijn Bezuijen, Lucas J van Vliet, Klammer Schutte, and Cris L Luengo Hendriks, in *Proceedings of SPIE* (SPIE, 2005), pp. 133-144.
- [142] Vijay Krishnamurthi, in *Proceedings of SPIE* (SPIE, 1996), pp. 18-25.
- [143] L H Schaefer, D Schuster, and J Schaffer, *Journal of Microscopy* **216**, 165-74 (2004).
- [144] Sapna A. Shroff, James R. Fienup, and David R. Williams, *Journal of the Optical Society of America A* **27**, 1770 (2010).
- [145] Anne Sentenac, Kamal Belkebir, Hugues Giovannini, and Patrick C Chaumet, *Journal of the Optical Society of America A* **26**, 2550 (2009).
- [146] Anne Sentenac, Kamal Belkebir, Hugues Giovannini, and Patrick C Chaumet, *Optics Letters* **33**, 255-7 (2008).
- [147] Y. Biraud, *Astronomy and Astrophysics* **1**, 124 (1969).
- [148] Giuseppe Vicidomini, S.W. Stefan W Hell, and Andreas Schönle, *Optics Letters* **34**, 3583 (2009).
- [149] D. Kundur and D. Hatzinakos, *IEEE Signal Processing Magazine* **13**, 43-64 (1996).
- [150] Michael R Beversluis, Garnett W Bryant, and Stephan J Stranick, *Journal of the Optical Society of America A* **25**, 1371 (2008).

- [151] Dror Fixler, Javier Garcia, Zeev Zalevsky, Aryeh Weiss, and Mordechai Deutsch, *Micron* (Oxford, England : 1993) **38**, 121-8 (2007).
- [152] Javier García, Zeev Zalevsky, and Dror Fixler, *Optics Express* **13**, 6073 (2005).
- [153] Andrew M. Maiden, Martin J. Humphry, Fucai Zhang, and John M. Rodenburg, *Journal of the Optical Society of America A* **28**, 604 (2011).
- [154] J. W. Goodman, in *Laser Speckle and Related Phenomena* (Springer Berlin / Heidelberg, 1975), pp. 9-75.
- [155] Anne-laure Fehrembach, Réseaux Résonnants À Bande Interdite Photonique, Nouveaux Filtres Pour Le D.W.D.M., 2003.
- [156] Anne-Laure Fehrembach, Daniel Maystre, and Anne Sentenac, *Journal of the Optical Society of America A* **19**, 1136 (2002).
- [157] Andreas Stemmer, Markus Beck, and M Aschwanden, *Journal of Microscopy* **232**, 99-105 (2008).
- [158] E. van Putten, D. Akbulut, J. Bertolotti, W. Vos, a. Lagendijk, and a. Mosk, *Physical Review Letters* **106**, 1-4 (2011).
- [159] Anatoly V. Zayats, Igor I. Smolyaninov, and Alexei a. Maradudin, *Physics Reports* **408**, 131-314 (2005).
- [160] William L Barnes, Alain Dereux, and Thomas W Ebbesen, *Nature* **424**, 824-30 (2003).
- [161] Igor Smolyaninov, Jill Elliott, Anatoly Zayats, and Christopher Davis, *Physical Review Letters* **94**, 1-4 (2005).
- [162] Tzu-Hsiang Lan and Chung-Hao Tien, *Optics Express* **18**, 23314-23 (2010).
- [163] Feifei Wei and Zhaowei Liu, *Nano Letters* **10**, 2531-6 (2010).
- [164] Anne Sentenac, Kamal Belkebir, Hugues Giovannini, and Patrick C Chaumet, *Optics Letters* **33**, 255-7 (2008).
- [165] Roger Petit, *Electromagnetic Theory of Gratings* (Springer Verlag, Berlin, 1980), p. 284.
- [166] C J Handmer, C Martijn De Sterke, R C McPhedran, L C Botten, M J Steel, and A Rahmani, *Optics Letters* **35**, 2846-8 (2010).
- [167] Lifeng Li, *Journal of the Optical Society of America A* **13**, 1870 (1996).
- [168] Lifeng Li, *Journal of the Optical Society of America A* **14**, 2758 (1997).
- [169] T Tamir and S T Peng, *Applied Physics* **14**, 235-254 (1977).
- [170] Pere Roca i Cabarrocas, *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* **14**, 655 (1996).

- [171] S. Y. Chou, P. R. Krauss, and P. J. Renstrom, *Science* **272**, 85-87 (1996).
- [172] G Oehrlein, *Surface Science* **386**, 222-230 (1997).
- [173] Andrea Cattoni, E. Cambril, D. Decanini, G. Faini, and a.M. Haghiri-Gosnet, *Microelectronic Engineering* **87**, 1015-1018 (2010).
- [174] Chunxiong Luo, Xiaofang Ni, Li Liu, Shin-ichiro M Nomura, and Yong Chen, *Biotechnology and Bioengineering* **105**, 854-9 (2010).
- [175] E. van Putten, D. Akbulut, J. Bertolotti, W. Vos, a. Lagendijk, and a. Mosk, *Physical Review Letters* **106**, 1-4 (2011).
- [176] Peter Kner, Bryant B Chhun, Eric R Griffis, Lukman Winoto, and Mats G L Gustafsson, *Nature Methods* **6**, 339-42 (2009).
- [177] Hanley, Verveer, Gemkow, Arndt-Jovin, and Jovin, *Journal of Microscopy* **196**, 317-331 (1999).
- [178] R. Heintzmann, Q. S. Hanley, D. Arndt-Jovin, and T. M. Jovin, *Journal of Microscopy* **204**, 119-135 (2002).
- [179] August Köhler, *Zeitschrift Für Wissenschaftliche Mikroskopie* **10**, 433 (1893).
- [180] H H Hopkins, *Proceedings of the Physical Society* **55**, 116-128 (1943).
- [181] Pochi Yeh, *Optical Waves in Layered Media*, 2nd ed. (Wiley, 2005), p. 416.

Résumé

Ce travail de thèse concerne l'amélioration du pouvoir de résolution de la microscopie optique en champ lointain. Nous avons étudié et développé des techniques permettant de dépasser la limite fondamentale de résolution établie par Abbe en 1873. Toutes tirent profit de la relation liant le champ électromagnétique émis ou diffracté par un objet à l'éclairement employé pour l'observer. En enregistrant plusieurs images du même objet sous différents éclairagements, puis en utilisant un algorithme d'inversion approprié, il est possible d'avoir accès à certaines fréquences spatiales de l'objet qui sont habituellement filtrées par le microscope.

Ce concept est d'abord appliqué à une technique de microscopie cohérente ne nécessitant pas le marquage de l'échantillon : la microscopie tomographique de diffraction. Cette méthode permet de reconstruire numériquement des cartes quantitatives de la permittivité diélectrique de l'objet avec une résolution significativement meilleure que celle d'un microscope large-champ classique à partir de plusieurs hologrammes de l'échantillon obtenus sous diverses incidences. Nous montrons théoriquement et expérimentalement que, loin d'être un désavantage, le phénomène de diffusion multiple permet, s'il est correctement pris en compte, d'atteindre des résolutions encore plus spectaculaires.

Nous étudions ensuite, avec des outils conceptuellement proches, la microscopie de fluorescence par éclairage structuré. Nous avons proposé deux approches différentes pour améliorer cette technique de microscopie. La première tire profit du développement d'un algorithme d'inversion capable de retrouver la densité de fluorescence de l'objet sans connaître les éclairagements utilisés *a priori*. Grâce à cet algorithme, nous pouvons remplacer le motif d'illumination habituellement périodique et contrôlé de la microscopie à éclairage structuré classique par des speckles aléatoires obtenus en bougeant un diffuseur à travers un faisceau laser. Des résultats expérimentaux très encourageants montrent l'efficacité de cette approche dont la mise en œuvre expérimentale est remarquablement simple. La seconde consiste à remplacer la lamelle de verre sur laquelle est déposé l'échantillon par une lamelle périodiquement nanostructurée. Celle-ci crée à sa surface une grille de lumière de période bien inférieure à la limite imposée par la diffraction, et qui peut être utilisée pour sonder les fréquences spatiales les plus élevées de l'échantillon. Nous détaillons la conception, la fabrication et la caractérisation expérimentale de ce substrat nanostructuré.

Summary

This PhD work focuses on the resolution improvement of far-field optical microscopy. We have studied and developed different techniques that take advantage of the relationship between the sample, the illumination and the diffracted (or emitted) field, in order to increase the final band-pass of the image beyond that imposed by the diffraction phenomenon. In these approaches, several images of the same sample are recorded under different illuminations. An inversion algorithm is then used to reconstruct a super-resolved map of the sample from the set of measurements.

This concept is first applied to coherent microscopy. In tomographic diffraction microscopy, many holograms of the same unstained sample are obtained under various incidences and the quantitative map of permittivity of the sample is reconstructed numerically from the set of data. The resolution is usually better than that of classical wide-field microscopy. We show theoretically and experimentally that, far from being a drawback, the presence of multiple scattering within the sample can, if properly accounted for, lead to an even better resolution.

We then study structured illumination fluorescence microscopy. We present two different ways for improving this method. The first one takes advantage of an inversion algorithm, which is able to retrieve the fluorescence density without knowing the illumination patterns. This algorithm permits one to replace the periodic light pattern classically used in structured illumination microscopy by unknown random speckle patterns. The implementation of the technique is thus considerably simplified while the resolution improvement remains. In the second approach, we propose to replace the coverslip on which the sample usually lays, by a sub-lambda grating. The latter is used to form, in near field, a light grid with sub-diffraction period that is able to probe the finest details of the sample. The design, fabrication and optical characterization of this key structure are detailed.